

**Isolierung und Pharmakokinetik des Proazulens Matricin aus
Matricaria recutita L.**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Mai Ramadan
aus Gaza/Palästina

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am:

04.03.2005

Erstgutachter:

Prof. Dr. P. Imming

Zweitgutachter:

Prof. Dr. G. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung am:

04.03.2005

**Für meine Familie
in Liebe und Dankbarkeit**

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut
für pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie
und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn
auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. P. Imming

dem ich für die wohlwollende Förderung meiner Arbeit und seine wertvollen Anregungen aus
mehreren Diskussionen herzlich danken möchte.

Herrn Prof. Dr. G. Seitz möchte ich nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens sehr
herzlich danken, sondern auch für seine großzügige Unterstützung
und die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Seyberth, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Erlaubnis, das Eicosanoidlabor zur Probenvorbereitung und zur Durchführung der HPLC-Analytik zu benutzen, sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der in-vivo-Untersuchungen in der Klinik.

Herrn B. Watzer, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg danke ich ganz herzlich für die wertvollen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit, sowie für die Durchführung von Prostanoid-Bestimmungen und massenspektrometrischen Vergleichsmessungen.

Frau Dr. med. J. Doroszewicz, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg danke ich für ihr starkes Engagement und die Überwachung der Probanden während der in-vivo-Untersuchungen.

Der Robugen GmbH, Esslingen, insbesondere Herrn Dr. B. Hempel, danke ich für fachliche und materielle Unterstützung, der Bodenhausen-Stiftung, Bad Arolsen, für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.-J. Hannig, Martin Bauer GmbH, danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Herrn Y.-Y. Ford, Horticulture Research International, UK, danke ich für die Durchführung der Untersuchungen zur Auxin-Wirkung.

Folgenden Studenten danke ich für ihre hilfreiche Mitarbeit im Rahmen der sogenannten Literaturarbeit: Anja Graf, Barbara Krauss, Maria Kasperczyk, Julia Orth, Susanne Auel und Sina Lang.

Auch den Mitarbeitern des Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen. Insbesondere Herrn Stephan Newel und Frau Susanne Schneider von der NMR-Abteilung, sowie Frau Hülya Yanardag und Frau Nina Zitzer von der MS-Abteilung danke ich für die Erfüllung zahlreicher Sonderwünsche und Frau Claudia Cloos für ihre Hilfsbereitschaft.

Meinen Arbeitskolleginnen und –Kollegen danke ich ganz herzlich für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. K. Bunke, Referat für ausländische Studierende der Philipps-Uni. Marburg und Herrn T. Komm, Referat für internationale Beziehungen der Philipps-Uni. Marburg danke ich ganz herzlich für ihre ständige Betreuung und breite Unterstützung und Ermutigung.

Herzlichen Dank an meine Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und den privaten Rückhalt für das Gelingen dieser Arbeit darstellten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Isolierung von Matricin	4
2.1	Extraktion von Matricin.....	5
2.1.1	Die Echte Kamille, <i>Matricaria recutita</i> L., Asteraceae.....	5
2.1.2	Isolierung von Matricin	7
2.1.2.1	Optimierung des Extraktionsverfahrens	8
2.1.3	Chromatographische Gewinnung von Matricin	14
2.1.4	Optimierung der Mazerationszeit	16
2.1.5	Identifizierung der Matricinkristalle.....	17
2.1.6	Matricingehalt verschiedener Kamillensorten.....	19
2.2	Quantitative Bestimmung von Matricin	20
2.2.1	Bestimmung von Matricin in Drogenmatrices und Extrakten.....	21
2.2.2	Kalibrierung der Methode	23
2.2.3	Validierung der Methode.....	23
2.2.3.1	Präzision	24
2.2.3.2	Die Nachweisgrenze	25
2.2.3.3	Die Bestimmungsgrenze.....	25
2.3	Zusammenfassung	26
3	Chamazulencarbonsäure.....	27
3.1	Pflanzliches Material	28
3.1.1	Die Gemeine Schafgarbe, <i>Achillea millefolium</i> L. s. l., Asteraceae.....	28
3.1.2	<i>Stevia serrata</i> Cav., Eupatorieae.....	30
3.2	Extraktion von <i>Achillea millefolium</i> L.....	30
3.3	Extraktion von <i>Stevia serrata</i> Cav.	32
3.4	Untersuchung der Enantiomerenreinheit	33
3.4.1	NMR-Spektroskopie zur Enantiomerenreinheitsbestimmung.....	34
3.4.2	NMR-Shift-Untersuchung von Chamazulencarbonsäure (9) isoliert aus <i>Stevia serrata</i> Cav.	34
3.5	Auxinwirkung der Chamazulencarbonsäure	37
3.6	Azulenderivate.....	40

3.6.1	Versuche zur Synthese von Chamazulencarbonsäure (4).....	40
3.6.1.1	Oxidationsversuche von S-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20)	46
3.6.1.2	Oxidation von 2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22)	48
3.6.1.3	Oxidation mit Kaliumpermanganat	49
3.6.2	Synthese von Chamaviolin (28)	50
3.6.3	Synthese von 7-Isopropyl-1-methyl-4-azulenessigsäure (29)	51
4	Pharmakokinetische und pharmakologische Charakterisierung.....	52
4.1	Literaturüberblick	52
4.2	In-vitro-Untersuchungen des Matricins.....	54
4.2.1	Behandlung mit künstlichem Magensaft	54
4.2.2	Behandlung mit künstlichem Dünndarmsaft	54
4.3	HPLC- Methode zur quantitativen Bestimmung von Chamazulencarbonsäure (2) im Serum.....	56
4.3.1	Entwicklung der Methode	56
4.3.2	Validierung der HPLC-Methode	58
4.3.2.1	Linearität.....	58
4.3.2.2	Präzision und Richtigkeit.....	59
4.3.2.3	Wiederfindungsrate	59
4.3.2.4	Bestimmungsgrenze.....	61
4.3.2.5	Selektivität	61
4.3.2.6	Empfindlichkeit	62
4.4	Extraktionsverfahren	62
4.4.1	Flüssig-flüssig Extraktion.....	62
4.4.2	Festphasenextraktion	66
4.5	In-vivo-Untersuchungen	67
4.5.1	Orale Gabe von Matricin	67
4.5.1.1	Matricin: eine in-vivo-Vorstufe der Chamazulencarbonsäure	68
4.5.1.2	Pharmakokinetische Parameter von Chamazulencarbonsäure	71
4.5.2	Orale Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl-ester (30)	73
4.6	Einfluss auf die Arachidonsäure-Kaskade.....	77
4.6.1	Ergebnisse und Diskussion.....	81
5	Zusammenfassung	83
6	Ausblick.....	86
7	Experimenteller Teil	88

7.1	Allgemeine Bemerkungen	88
7.1.1	Allgemeines	88
7.2	Analytik	88
7.2.1	Allgemeine Methoden	88
7.2.2	DC-Scanner	90
7.2.2.1	Probenvorbereitung und Standardlösungen	90
7.2.2.2	Kalibrierung	92
7.2.2.3	Validierung	92
7.2.2.4	In-vitro-Untersuchungen des Matricins	93
7.2.3	Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)	95
7.2.3.1	Geräte	95
7.2.3.2	Chemikalien und Materialien	95
7.2.3.3	Probenvorbereitung und Standardlösungen	96
7.2.3.4	Kalibrierung	98
7.2.3.5	Validierung	98
7.2.3.6	Optimierung des Extraktionsverfahrens	99
7.2.3.7	Semiquantitative Untersuchung der Plasmaproben nach oraler Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl-ester (30)	99
7.2.4	Dünnschichtchromatographie (DC)	100
7.3	Isolierungen	101
7.3.1	Isolierung von Matricin (1)	101
7.3.1.1	Nach optimierter Methode	101
7.3.1.2	Nach Stahl-Methode	103
7.3.2	Isolierung von Chamazulencarbonsäure (2)	105
7.3.2.1	Aus <i>Achillea collina</i> Becker PROA	105
7.3.2.2	Aus <i>Stevia serrata</i> Cav	105
7.4	(-)-(3S*.3aR*.4S*.9R*.9aS*.9bS*)-4-Acetoxy-2.3.3a.4.5.9.9a.9b-octahydro-9- hydroxy-3.6.9-trimethylazuleno[4.5b]furan-2-on (Matricin) (1)	107
7.5	(S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäure (Chamazulencarbonsäure) (2) ...	109
7.6	¹ H-NMR-spektroskopische Shift-Untersuchung mit Eu(hfc) ₃	111
7.7	Synthesen	112
7.7.1	(S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäuremethylester (13)	112
7.7.2	2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20)	114
7.7.3	1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-2-ol (19)	116

7.7.4	2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionaldehyd (21)	119
7.7.5	7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd (Chamaviolin) (28).....	121
7.7.6	(7-Isopropyl-1-methylazulen-4-yl)-essigsäure (29)	123
7.7.7	(S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäure-2,2-dimethylpropionyloxymethyl- ester (30).....	125
7.7.8	(+)-2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22).....	127
7.8	Oxidationsversuche	129
7.8.1	Oxidation von (20) mit Kaliumpermanganat in Benzol	129
7.8.2	Oxidation von (20) mit Kaliumpermanganat in CH ₂ Cl ₂	131
7.8.3	Oxidation von (19) mit Bariummanganat.....	133
7.8.4	Oxidation von Chamazulen (3) mit DDQ.....	135
7.8.5	Oxidation von (22) mit PDC in DMF	136
	Literaturverzeichnis	138
	Abkürzungsverzeichnis	149

Kapitel 1

Einleitung und Zielsetzung

Die echte Kamille (*Matricaria recutita* L.) ist nicht nur eine der ältesten Heilpflanzen der Menschheit überhaupt, sondern auch eine der am besten erforschten. Ihre entzündungshemmende Wirkung ist heutzutage bei allen Arten von Wundsein unbestritten, sowohl äußerlich als auch innerlich.¹⁻⁴

Die therapeutisch interessanten lipophilen Inhaltsstoffe, denen weitgehend die antiphlogistische Wirksamkeit der Kamille zugesprochen wird, finden sich teilweise in dem blaugrünen ätherischen Öl. Dazu gehören (-)- α -Bisabolol, die Bisabololoxide, die En-In-Dicycloether und das Chamazulen. Chamazulen (3), das dem ätherischen Öl die blaue Farbe verleiht, kommt selbst in der Pflanze nicht vor, sondern entsteht erst durch die Zersetzung des genuin in der Kamille gebildeten Matricins (1) über *S*-Chamazulencarbonsäure (2)⁵ als Zwischenprodukt der Umwandlung (Abb. 1.1).

Zu den hydrophilen Wirksubstanzen zählen die Flavonoide, vor allem das Apigenin-7-glucosid und dessen Aglycon Apigenin sowie Schleimstoffe.

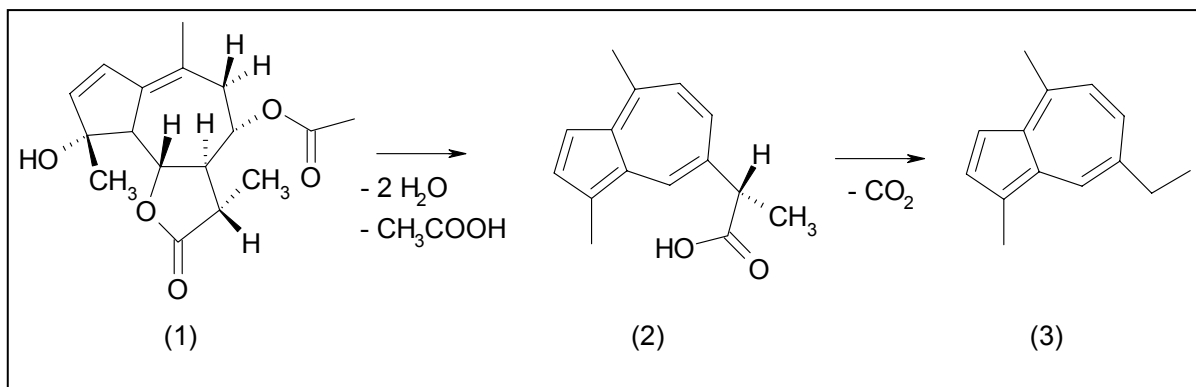


Abb. 1.1: Abbaureaktion des Matricins (1) zu Chamazulen (3) über *S*-Chamazulencarbonsäure (2).

Matricin (1) und Chamazulen (3) zeichnen sich vor allem durch ihre antiphlogistische Wirkung aus. Ammon (1996)⁶ untersuchte in vitro die Wirkung von Kamilleninhaltsstoffen auf die Bildung von Entzündungsmediatoren. Er stellte dabei fest, dass das Matricin keinen Einfluss auf die Schlüsselenzyme der Arachidonsäurekaskade hat. Chamazulen hingegen greift in die Arachidonsäurekaskade ein, indem es die Leukotrien B₄-Bildung (katalysiert durch 5-Lipoxygenase) inhibiert und zudem antioxidativ wirkt.^{6,7}

In-vivo-Untersuchungen lieferten jedoch gegenteilige Resultate.^{8,9} Matricin (1) und (-)- α -Bisabolol waren nach peroraler Gabe am Carageenan-induzierten Rattenpfotenödem gleich wirksam. Chamazulen (3) wirkte dagegen nur halb so stark.⁸

Nach lokaler Applikation am Mausohrödem zeigte Matricin eine zehnfach stärkere Wirkung als Chamazulen.⁹

Trotz zahlreicher Publikationen, welche die pharmakologische Wirkung einzelner Kamilleninhaltsstoffe behandeln, wurde die Wirkung von Chamazulencarbonsäure (2), die bereits 1953 von Stahl isoliert wurde,¹⁰ erst 2001 sowohl in vitro als auch in vivo untersucht.¹¹⁻¹³

In-vitro-Untersuchungen ergaben, dass Chamazulencarbonsäure (2) ein selektiver COX-2-Hemmer ist. Die antiphlogistische Aktivität von (2) nach lokaler und peroraler Gabe wurde durch Standard-Tiermodelle ermittelt. Chamazulencarbonsäure war nach oraler Gabe eines Prodrug-Esters, des Oxymethylpivaloylestere, systemisch im Modell des Carrageenan-induzierten Rattenpfotenödems mit ca. 75% der Wirkung von Acetylsalicylsäure antiphlogistisch aktiv. In einem Mausohrödemmodell einer akuten Entzündung war sie ungefähr genauso potent wie S-Naproxen. In einem Modell chronisch-immunologischer Entzündung war sie wie Kamillen-zubereitungen allgemein unwirksam.¹⁴

Da Matricin in vitro unwirksam ist, in vivo jedoch deutlich höhere antiphlogistische Wirksamkeit als das Chamazulen aufweist, lässt sich daraus folgern, dass Matricin nur eine Vorstufe des antiphlogistisch wirksamen Stoffes darstellt, was durch Chamazulen nicht zu erklären ist.

Ziel dieser Arbeit ist daher, der Frage nachzugehen, inwieweit die Chamazulencarbonsäure die entzündungshemmende Wirkung des Kamillenproazulens Matricin erklären könnte.

Die Schritte der Vorgehensweise sind folgende:

- Isolierung einer ausreichenden Menge an Matricin aus Kamillenblüten.
- Entwicklung von Methoden zur chromatographischen Matricingewinnung und zur quantitativen Matricinbestimmung.
- Extraktion von Chamazulencarbonsäure aus *Achillea millefolium* L. Außerdem Untersuchungen zu ihrer stereochemischen Charakterisierung und Herstellung von Azulenderivaten.
- In-vitro-Untersuchungen des Matricins.
- Entwicklung und Validierung eines HPLC-Assays für die quantitative Bestimmung von Chamazulencarbonsäure im Blut.
- Assay der Blutspiegel von Chamazulencarbonsäure nach oraler Gabe von Matricin und Oxymethylpivaloyl-ester der Chamazulencarbonsäure an gesunde Probanden.

Kapitel 2

Isolierung von Matricin

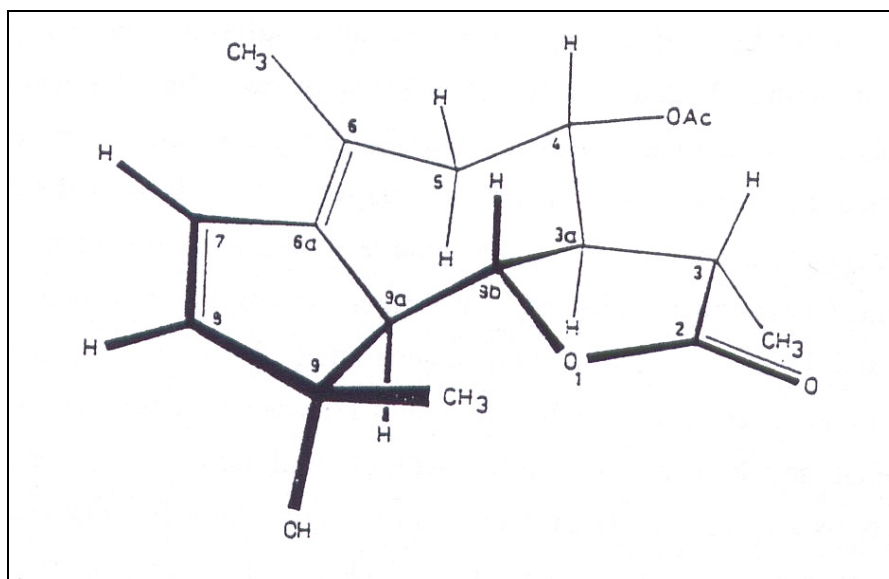


Abb. 2.1: Matricin [(-)-(3S*.3aR*.4S*.9R*.9aS*.9bS*)-4-Acetoxy-2.3.3a.4.5.9.9a.9b-octahydro-9-hydroxy-3.6.9-trimethylazuleno[4.5b]furan-2-on] (IUPAC).

Matricin (Abb. 2.1) ist ein genuin in der Kamille vorkommendes Proazulen, dessen Existenz in der Literatur sehr lange umstritten blieb.¹⁵⁻¹⁸ Koch (1942)¹⁹ hatte einen definitiven Nachweis für das Vorhandensein eines Proazulens in Kamille gefunden. Cekan und Mitarbeiter (1954)²⁰ isolierten diese Substanz – Matricin genannt – und konnten ihre Struktur (1957)²¹ nach langwierigen IR-Untersuchungen aufklären. (1982)²² wurde die chemische Konstitution des Matricins von Flaskamp et al. mit NMR-Spektroskopie ermittelt. Die absolute Konfiguration wurde 2001 aus der absoluten Konfiguration des Matricin-Abbauprodukts Chamazulencarbonsäure bestätigt.⁵

Im Folgenden werden zunächst das pflanzliche Material sowie die Isolierung von Matricin beschrieben. Anschließend wird unsere Methode zur quantitativen Bestimmung von Matricin aus Kamillenblüten mittels Scannen des Dünnschichtchromatogramms vorgestellt.

2.1 Extraktion von Matricin

Die Kamillenblüten proazulenreicher, aus kontrolliertem Anbau gewonnener, unterschiedlicher, gezüchteter Sorten der echten Kamille der Fa. Martin Bauer GmbH & Co. KG, Ernte aus den Jahren 2001, 2002, 2003 und 2004 sind im Rahmen dieser Arbeit auf den Matricin Gehalt untersucht und zur Gewinnung von Matricin benutzt worden.

2.1.1 Die Echte Kamille, *Matricaria recutita* L., Asteraceae

Matricaria leitet sich vom lateinischen *mater* (Mutter) bzw. *Matrix* (Gebärmutter) ab und bezieht sich auf die frühere Verwendung bei Krankheiten des Wochenbettes. Aus dem Griechischen leitet sich das Wort *chamaimelon* von *chamai* (niedrig) und *melon* (Apfel) für Kamille ab, daraus resultiert der Name (niedrig wachsender Apfel) der auf das apfelartige Aroma der Blüten hindeutet.^{3,23}

Die Bezeichnung der echten Kamille erfolgte in den Arzneibüchern über lange Zeit als *Matricaria chamomilla*, bis Rauschert sie erneut systematisch bearbeitete, so dass sie heute oft als *Chamomilla recutita* L. Rauschert bezeichnet wird.^{3,24}

Den Namen *Matricaria recutita* (L.) scheint Linné eindeutig für unsere medizinisch-pharmazeutisch genutzte Kamille (Kamillenblüten/*Matricariae flos*) verwendet zu haben.³

Matricaria recutita L. ist in Süd- und Osteuropa sowie Vorderasien beheimatet. Heute ist sie über ganz Europa, Nordamerika und in Australien verbreitet.



Abb. 2.2: *Matricaria recutita* L., Asteraceae.²⁶

Die Pflanze ist ein 20 bis 40 cm hohes Kraut mit aufrechten Stängeln, die oben kahl und ästig sind. Die Blätter sind 2-3fach fiederspaltig. Die Blütenköpfe stehen endständig, sind lang gestielt und weiß mit gelber Mitte. Die Hüllblätter sind stumpf und randhäutig. Die gelben Scheibenblüten sind röhrig, zwittrig und 5zählig²⁵ (Abb. 2.2).²⁶

Matricin findet sich nur in den Einzelblüten (Zungen- und Röhrenblüten) der Kamille, nicht aber im Boden der Blütenköpfchen.²⁷

Schon die alten Ägypter schätzten die Kamille. Nach Zeugnissen der Griechen Aetios (6. Jhdt.) und Galen wurde die Kamille als Mittel gegen Fieber (Malaria) verwendet. Hippokrates benutzte Kamille für Einlagen gegen Menstruationsbeschwerden; die späteren antiken Gelehrten (Plinius, Dioscurides und Galen) empfahlen Kamillentee und -bäder gegen Frauenleiden, gegen Darmverschlingung, Gelbsucht, Blähungen und Leberleiden. Auch äußerliche Anwendung wurde beschrieben: Dazu wird die Kamille gekaut und sollte zur Beseitigung eiternder Zahnfleischgeschwüre dienen. Arabische Ärzte verwendeten das Kamillenöl zum Einreiben bei Neuralgien. Bei Hildegard von Bingen findet die Pflanze nur wenig Berücksichtigung. Sie wurde vermutlich nur bei Frauenleiden verordnet. 1488 erwähnte Saladin in seinem Compendium ein Oleum infusum unter der Bezeichnung secundum Mesue.

Ein Destillat findet man bei Johannes Cramerarius in dessen „Hortus Medicus et Philosophicus“ aus dem Jahre 1588, der es als himmelblaues Kamillenöl beschrieb.

Die Kenntnis der Heilwirkung der Kamille hielt sich durch das Mittelalter, und sie hat bis in unsere Zeit nicht an Wertschätzung eingebüßt.²

Heutzutage werden Kamillenzubereitungen innerlich vor allem bei Spasmen und entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes angewendet. Äußerlich werden Haut- und Schleimhautentzündungen sowie bakterielle Hauterkrankungen auch der Mundhöhle und des Zahnfleisches behandelt. Kamillendampfbäder werden erfolgreich bei entzündlichen Erkrankungen der Nasen- und Nebenhöhlen eingesetzt.²⁸

Die Kamilleninhaltsstoffe lassen sich grob in eine lipophile und eine hydrophile Gruppe einordnen. Zu den lipophilen Inhaltsstoffen, denen weitgehend die antiphlogistische Wirksamkeit der Kamille zugesprochen wird, gehören die Hauptbestandteile des ätherischen Öls, also (-)- α -Bisabolol, die Bisabololoxide, die En-In-Dicycloether und das Chamazulen. Chamazulen kommt in der Pflanze nicht vor, sondern entsteht erst durch Zersetzung eines Proazulens, des Sesquiterpenlactons Matricin. Zu den hydrophilen Wirksubstanzen zählen die Flavonoide, vor allem das Apigenin-7-glucosid und dessen Aglycon Apigenin sowie Schleimstoffe.²⁵

Die Kamille ist in über 90 Präparaten (Mono- oder Kombinationspräparate) in Deutschland enthalten.⁴ Der jährliche Verbrauch an Kamillen in Deutschland ist mit 3000 Tonnen erstaunlich groß; ungefähr 500 Tonnen werden für Arzneimittel, 2500 Tonnen für Lebensmittel verwendet.²⁹

2.1.2 Isolierung von Matricin

Obwohl die Isolierung von Matricin in der Literatur mehrfach beschrieben wurde, gilt sie nach wie vor als schwierig.

Cekan et al. (1954)²⁰ isolierten Matricin aus einem proazulenhaltigen Petroletherextrakt durch Ausschütteln mit einer verdünnten wässrigen Kaliumhydrogencarbonatlösung. Matricin lässt sich aus dieser Lösung mit Ether extrahieren. Durch das Ausschütteln mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität werden die lipophilen Begleitstoffe von den hydrophilen abgetrennt. Dieses Vorgehen wird von allen weiteren Autoren, die die Isolierung von Matricin beschreiben, beibehalten.

Stahl und Schild (1981)³⁰ isolierten Matricin ausgehend von einem Chloroformextrakt, da sie mit diesem Lösungsmittel eine bessere Ausnutzung der Droge erreichten. Nach ihrer Methode werden die Kamillenblüten in zwei Portionen je zwei Mal mit Chloroform drei Minuten lang extrahiert und danach gepresst. Beim Eingießen des eingengten Chloroformextraktes in Petrolether fallen die polaren Inhaltsstoffe aus, so dass eine Vortrennung erreicht wird. Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach Cekan et al.²⁰ Die Extraktion ist in Abbildung 2.3 als Fließschema dargestellt.

Die am Ende des Isolierungsprozesses erhaltenen gelben Rohmatricinkristalle wurden durch mehrmaliges Waschen mit Diethylether gereinigt. Einen Schritt weiter gingen Flaskamp et al. (1982)²² und bereiteten das Rohmatricin säulenchromatographisch auf. Nach Trennung über eine Al₂O₃-Säule der Aktivitätsstufe IV erhielten sie reinweiße Matricinkristalle. Ghassemi (1988)³¹ isolierte sehr geringe Mengen an radioaktiv markiertem Matricin über eine Kieselgelsäule. Ness (1995)³² gelang eine erschöpfende Extraktion der Kamillenblüten (ca. 93% Matricingewinn aus der Droge) durch Reperkolation mit geringer Menge an Lösungsmittel, aber der Zeitaufwand gegenüber der Mazeration war deutlich höher. Die Elutionskraft unterschiedlicher Lösungsmittel für Matricin wurde untersucht. Näher diskutiert wurden auch die kritischen Aufarbeitungsschritte des Chloroformextrakts, die hohe Ausbeuteverluste von Matricin mit sich bringen.³²

2.1.2.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Das Extraktionsverfahren von Matricin nach Stahl³⁰ wurde von uns modifiziert, um die Ausbeuteverluste an Matricin und gleichzeitig den Zeitaufwand zu verringern (s. Abb. 2.3). Es war wichtig, die optimale Extraktionszeit herauszufinden, um eine möglichst hohe Matricinausbeute zu erzielen und ein Rohprodukt mit wenigen Begleitstoffen zu gewinnen.

Herstellung des Chloroformextrakts

Eine erschöpfende Extraktion der Kamillenblüten konnte durch eine Mazeration bei Raumtemperatur in 1½ Stunden erreicht werden; längere Extraktionszeiten erhöhten den Gehalt an Fremdsubstanzen relativ zu stark (s. 2.1.4).

Verglichen mit dem Verfahren von Stahl genügte ein Viertel des Lösungsmittels, was durch die Ausbeute von 97% Matricin aus der Droge dokumentiert wird.

Vortrennung des Chloroformextrakts

Eine Vortrennung von polaren Stoffen erfolgt durch Einrühren des Chloroformextrakts in Petrolether, was mit einem Matricinverlust von 2% verbunden ist. Im Zuge dieser Vortrennung werden 20% der Ausgangsmenge des Chloroformextrakts dadurch abgetrennt (s. 7.3.1.1).

Eine zweite Variante zur Vortrennung ist die Behandlung des Chloroformextrakts mit Methanol. Dies wurde versucht, da Kamillenblüten mit einer Wachsschicht bedeckt sind. Weil Matricin sehr gut in Methanol löslich ist, die Wachse jedoch nicht, wurde der Chloroformextrakt mit Methanol behandelt. Dabei ist zum einen kaum Matricin verloren gegangen, zum anderen konnten ca. 60% des Chloroformextrakts abgetrennt werden. (s. Tab. 2.1)

Ein ähnliches Verfahren wurde zur Wachsabtrennung bei der Artabsin-Isolierung aus Wermutkraut beschrieben.³³

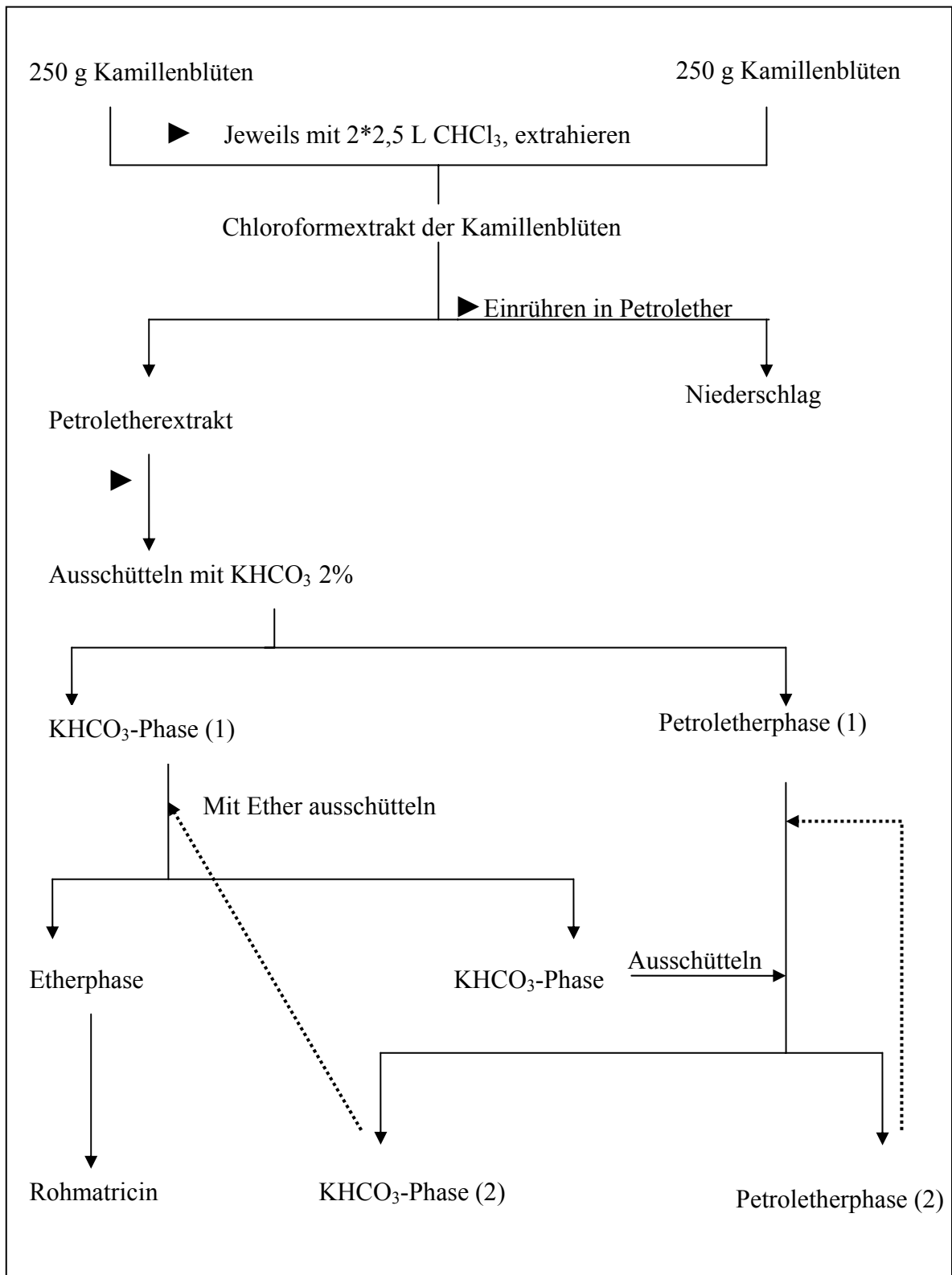


Abb.2.3: Die Extraktion von Matricin aus Kamillenblüten nach Stahl.³⁰

► Von uns modifizierte Schritte.

Säulenchromatographie

Die vorgetrennten Chloroformextrakte wurden an Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (s. 2.1.3).

Das zu bearbeitende Material wird auf ca. 5% der ursprünglichen Menge reduziert, d.h. 95% des Chloroformextrakts sind nun abgetrennt.

Erfolgt nach der Säulenchromatographie eine Umkristallisation, so erhält man dunkelgelbe, zu 75% reine Matricinkristalle. Man kann den erhaltenen Rückstand aber auch durch Ausschütteln weiterverarbeiten.

Ausschüttlung

Nach dem Auflösen der matricinhaltigen Säulenchromatographiefraktionen eines Chloroformextrakts aus 1.5 kg Kamillenblüten (3-4 Ansätze) in Petrolether erfolgte das Ausschütteln mit Kaliumhydrogencarbonatlösung und Diethylether nach der Vorgehensweise von Cekan et al.²⁰

Der Ausschüttelvorgang ist ein kritischer Schritt, der hohe Verluste mit sich bringt (32% des Matricins gehen verloren).³² Um trotz der Emulsionsbildung in der Zwischenphase sowie der geringen Löslichkeit des Matricins in der wässrigen Phase eine gute Ausbeute zu erreichen, wird der Vorgang zwölfmal wiederholt. Eine Verbesserung der Trennung wird durch Zentrifugieren (20.000 rpm, 15 min.) erreicht. Dies ist aber sehr zeitaufwändig.

Nach der Säulenchromatographie an Kieselgel ist eine schnelle Ausschüttelung ohne Zentrifugieren mit geringem Verlust an Matricin möglich.

Beim Ausschütteln der Petroletherphase mit Kaliumhydrogencarbonatlösung soll Matricin als mittelpolare Substanz von den lipophilen Bestandteilen abgetrennt werden. Die Zwischenphase war nicht emulgiert, sondern als Zwischenphase an der Grenzfläche. Die Trennung erfolgte ohne Zentrifuge und ohne Verwerfen der matricinreichen Mittelschicht am Ende des Prozesses. Die 10-12malige Wiederholung des Vorgangs ist unvermeidlich, um das schlecht wasserlösliche Matricin in die wässrige Phase zu überführen.

Das zweite Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Diethylether verläuft quantitativ, was auf die höhere Affinität von Matricin zu lipophilen Lösungsmitteln hinweist.

Durch diese Vorgehensweise, d.h. eine Behandlung des Chloroformextrakts mit Methanol und eine zusätzliche Trennung mittels Säulenchromatographie, wird das auszuschüttelnde Material reduziert. Dieses Material ist matricinreich und der Ausschüttelvorgang läuft ohne Zentrifuge, was viel Zeit spart; denn der ganze Ausschüttelvorgang hätte pro Extrakt von jeweils 250 g Droge wiederholt werden müssen.

Die nun stattfindende Umkristallisation des aus ca. 1.5 kg Kamillenblüten erhaltenen Rohmatricins ist durch den hohen Gehalt an Matricin erleichtert. Die Matricinkristalle sind leicht gelblich und zu 90% rein.

Schließlich ist eine weitere säulenchromatographische Reinigung des Rohmatricins an einer neutralen Al_2O_3 -Säule mit einem Verlust von ungefähr 8% verbunden. Matricin muss schnell aus der Säule eluiert werden, um eine Zersetzung auf der Säule zu vermeiden. Danach ist noch eine Umkristallisation aus Diethylether nötig, um das Matricin in hochreinem Zustand zu erhalten.

Umkristallisation

Der Umkristallisationsschritt ist sehr schwierig. Auch gelingt es nicht immer, das Matricin in kristalliner Form zu erhalten.

Die besten Ergebnisse erhält man nach Lösen des Rohmatricins in getrocknetem Diethylether durch langsames Verdampfen des Solvens im Kühlschrank oder unter dem Abzug. Relativ gute Ausbeuten werden nach Umkristallisation aus Diisopropylether/Aceton (2:1) erhalten.

Die einzelnen Schritte bei der Matricinisolierung sind in Abb. 2.4 dargestellt. Der gesamte Verlauf der Isolierung bis zum hochreinen kristallinen Matricin wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, indem die Matricinausbeuten bei jedem Isolierungsschritt mittels Densitometrie bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2.1a und 2.1b dargestellt.

Medium	Matricingehalt		Matricinverluste bei dem jeweiligen Schritt (%)
	absolut (mg)	(%)	
Droge (300 g)	540	100	
Petroletherextrakt	528	98	2
Säulenchromatographie des Petroletherextrakts	390	75	26
Wasserfreier Diethylether nach Ausschüttelung aus KHCO ₃ -Lösung	348	64	7.5
Matricinkristalle nach Umkristallisation	297	55	9
Nach Al ₂ O ₃ Säulenchromatographie	253	47	8
Reine Matricinkristalle nach Umkristallisation	210	39	8

Tab. 2.1a: Ausbeuten an Matricin während der Isolierung bei Aufarbeitung von 300 g Kamillenblüten der Sorte Manzana Ernte 2003.

Medium	Matricingehalt		Matricinverluste bei dem jeweiligen Schritt (%)
	absolut (mg)	(%)	
Droge (300 g)	540	100	
Methanolextrakt	540	100	0
Säulenchromatographie des Methanolextrakts	432	80	20
Wasserfreier Diethylether nach Ausschüttelung aus KHCO ₃ -Lösung	390	73	7
Matricinkristalle nach Umkristallisation	324	60	13
Nach Al ₂ O ₃ Säulenchromatographie	270	50	10
Reine Matricinkristalle nach Umkristallisation	227	42	8

Tab. 2.1b: Ausbeuten an Matricin während der Isolierung bei Aufarbeitung von 300 g Kamillenblüten der Sorte Manzana Ernte 2003.

2.1.3 Chromatographische Gewinnung von Matricin

Die säulenchromatographische Trennung von Komponenten des ätherischen Öls ist bereits unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt worden.³

Spitzer (1967)³⁴ hat Matricin mit präparativer Dünnschichtchromatographie aus einem Chloroformextrakt von *Artemisia caruthii* isoliert. Schneider (1979)³⁵ hat einen 70prozentigen methanolischen Extrakt aus *Artemisia absinthium* an einer Aluminiumoxid-N Säule chromatographiert und Matricin zusammen mit Bitterstoffen gewonnen. Mittels präparativer HPLC haben Belliardo und Appendino (1981)^{36,37} einen Chloroformextrakt aus *Artemisia arborescens* in neun Fraktionen aufgetrennt; nach erneuter präparativer HPLC wurden geringe Mengen an Matricin isoliert.

Ghassemi (1988)³¹ isolierte eine sehr kleine Menge radioaktiv markiertes Matricin aus einem Kamillenextrakt nach Säulenchromatographie an einer Kieselgelsäule.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Abtrennung von Matricin aus dem Chloroformextrakt von Kamillenblüten verschiedene Fließmittel mit Kieselgel als stationärer Phase überprüft. Dabei zeigte das Fließmittelgemisch Chloroform/tert-Butylmethylether (5:1) die besten Trenneigenschaften für Matricin mit einem R_f -Wert von 0.2. Die Säulenchromatographie an Kieselgel erfolgt zunächst mit Chloroform/tert-Butylmethylether (5:1), anschließend wird Matricin mit tert-Butylmethylether eluiert.

Die DC-Prüfung der durch Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen ist in Abb. 2.5 dargestellt.

Es ist mit einem Verlust an Matricin bis ca. 25% der gesamten Menge zu rechnen (s. Tab. 2.1a u. 2.1b). Eine befriedigende Vorreinigung ohne nennenswerte Verluste steht allerdings noch aus.

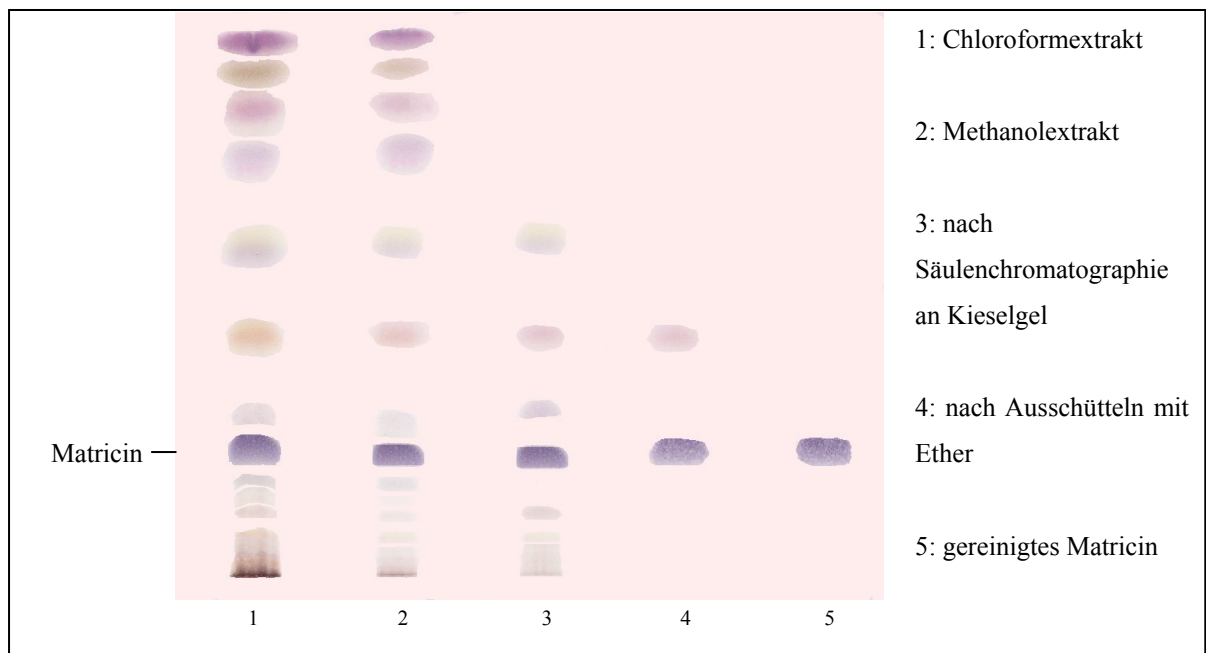


Abb. 2.4: Dünnschichtchromatogramm der einzelnen Schritte bei der Isolierung von Matricin. Detektion: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, 5 min bei 105 °C im Trockenschrank erhitzt.

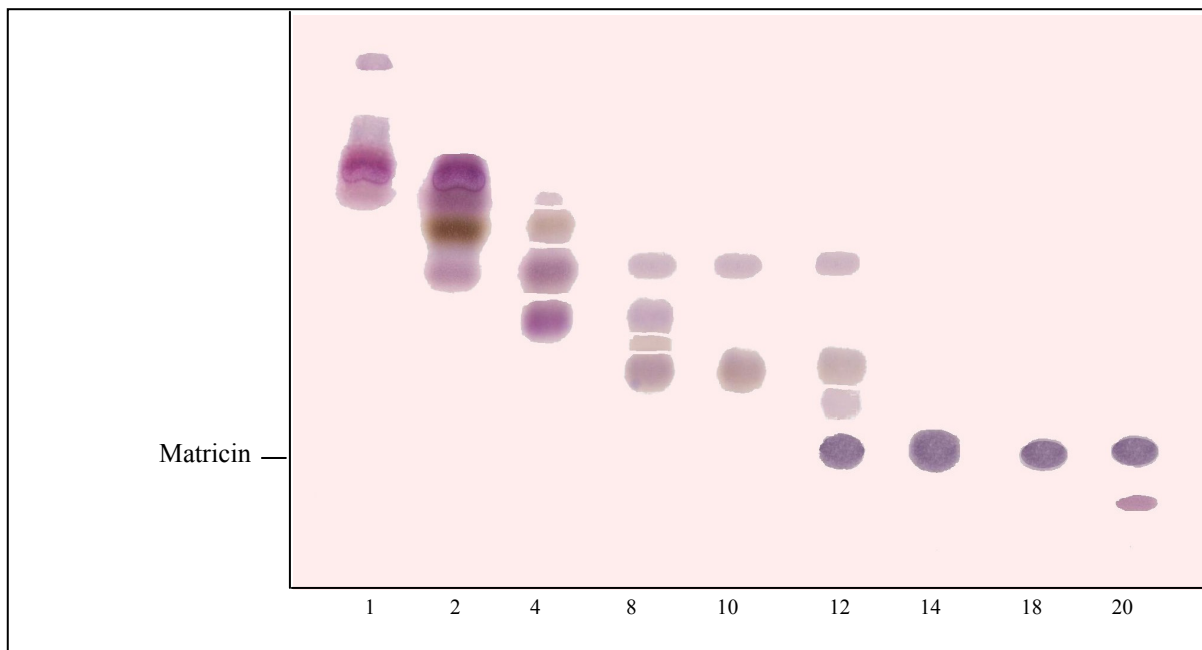


Abb. 2.5: DC-Prüfung der Säulenchromatographie-Fractionen an Kieselgel, Fließmittel: Chloroform/tert-Butylmethylether (5:1), eines mit Methanol behandelten Chloroformextrakts aus Kamille.

2.1.4 Optimierung der Mazurationszeit

Die Elutionskraft unterschiedlicher Lösungsmittel wurde in der Literatur beschrieben.³² Keine Angaben finden sich über die optimale Extraktionszeit. Die quantitative Bestimmung von Matricin mittels der zuvor entwickelten Methode (s. 2.3) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mazurationszeiten mit Chloroform wird in Abb. 2.6 dargestellt. Eine Extraktionszeit von 1½ Stunden war optimal und hat zu einem Matricingewinn bis zu 97% aus der Droge geführt. Längere Zeiten verringern die Ausbeute. Dies lässt sich durch die Rückdiffusion in die Blüten und die Zersetzung des Matricins erklären. Nach 12 Stunden ist die Ausbeute wieder ungefähr so hoch wie nach 1½ Stunden, aber mit einem höheren Gehalt an anderen Stoffen, was auch durch die Schwankungsbreite der Genauigkeit des quantitativen DC-Scanners bedingt sein könnte. Das wirkt sich wiederum negativ auf die folgende Bearbeitung aus.

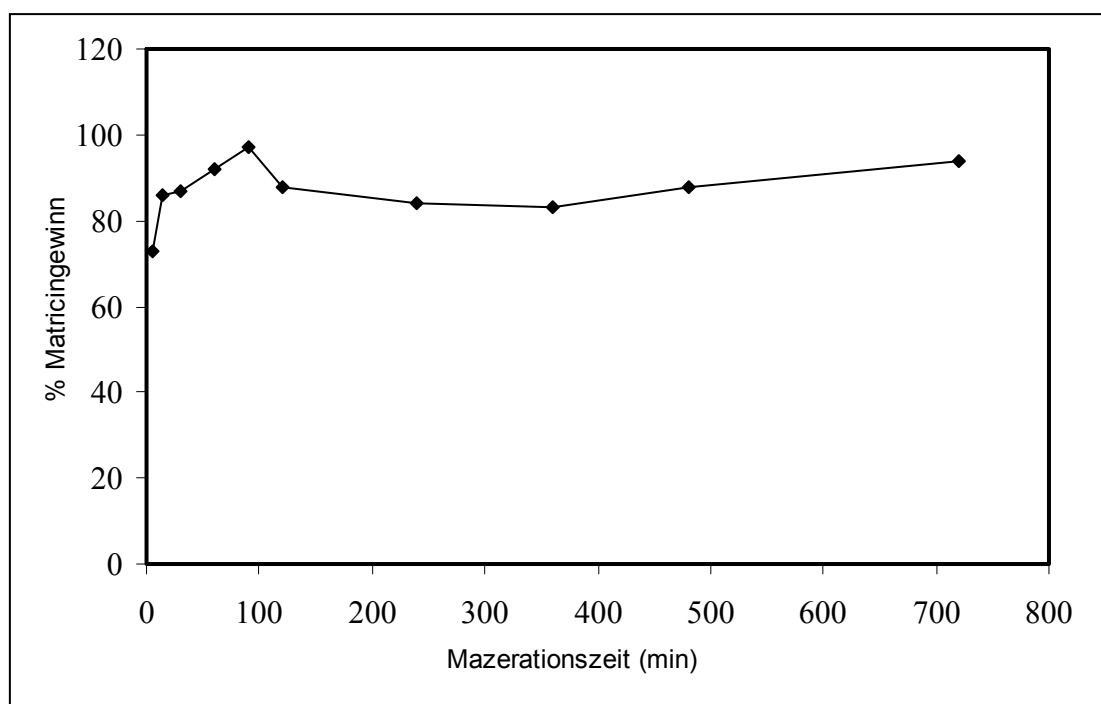


Abb. 2.6: Optimierung der Mazurationszeit der Kamille zum Matricingewinn. Quantitative Bestimmung durch DC/Densitometrie.

2.1.5 Identifizierung der Matricinkristalle

Bestimmung des Schmelzpunktes

Der Schmelzpunkt von 159 °C unter Zersetzung der isolierten Matricinkristalle stimmte mit der Literatur überein.³²

DC-Überprüfung

Es wurde mit einer Matricin-Vergleichslösung und einem matricinhaltigen Extrakt gearbeitet. Der Nachweis erfolgt durch den Vergleich der R_f -Werte nach UV-Detektion bei 254 nm und nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz.³⁰

UV-Spektrum

Das UV-Spektrum von Matricin stimmt mit den Literaturangaben überein. Das Absorptionsmaximum liegt bei 244 nm.²⁰

IR-Spektrum

Das Spektrum des isolierten Matricins ist mit dem der Literatur identisch.³⁰

MS-Spektrum

Die exakte Molekülmasse von Matricin wird durch die Aufnahme eines hochauflösenden EI-Massenspektrums (EI = Elektronenstoßionisierung) bestimmt. Wegen der drastischeren Ionisierungsbedingungen bei EI wird kein M^+ -Ion, sondern ein $[M-H_2O]^+$ mit dem erwarteten Wert von m/z 288.1348 erhalten.

1H -NMR

Das Spektrum entspricht den publizierten Daten.¹¹ (Abb. 2.7)

^{13}C -NMR

Das Spektrum entspricht den publizierten Daten.¹¹ (Abb. 2.8)

DC-Scanner

Aufnahme des Remissionsortspektrums. (s. 2.2)

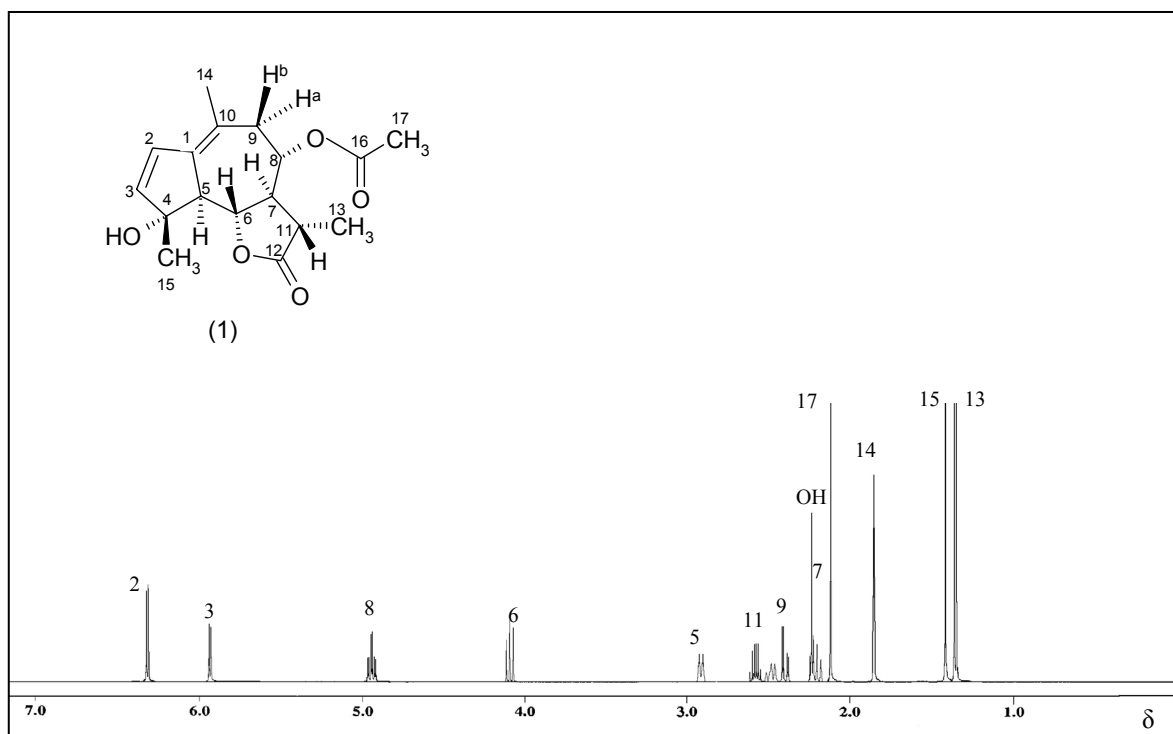


Abb. 2.7: ^1H -NMR-Spektrum von Matricin (1) in CDCl_3 .

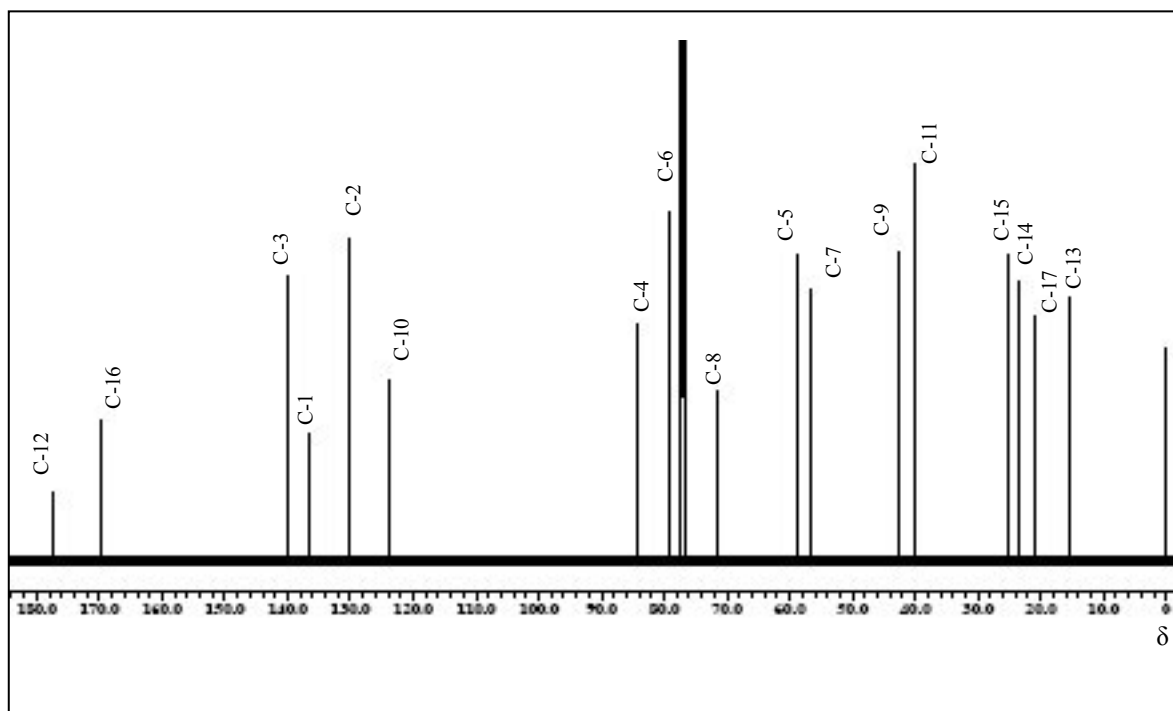


Abb. 2.8: ^{13}C -NMR-Spektrum von Matricin (1) in CDCl_3 .

2.1.6 Matricingehalt verschiedener Kamillensorten

Verschiedene Kamillensorten, die sich durch einen hohen Gehalt an Proazulenen auszeichnen, wurden auf ihren Matricingehalt untersucht. Zur quantitativen Bestimmung diente die in 2.3 beschriebene Methode.

Die in Tabelle 2.2 gezeigten Werte verdeutlichen, dass die Sorte Manzana, welche durch ihren hohen Gehalt an Bisabolol und Apigenin bekannt ist, auch matricinreich ist.

Manzana ist eine tetraploidierte Sorte. Als Ausgangsmaterial für Manzana verwendete man die diploide Degumille[®], welche in Spanien endemisch vorkommt.³ Mabamille, eine geschützte Sorte der Firmen Martin Bauer und Robugen, wird u. a. in Thüringen angebaut; sie zeigt einen geringeren Matricingehalt. Kirsch, eine gezüchtete Sorte der Firmen Martin Bauer und Robugen, die zum Matricingewinn angebaut wird, zeigt einen variablen Gehalt. Die Variabilität des Gehaltes eines pflanzlichen Inhaltsstoffs wird im wesentlichen von der genetischen Konstitution des Pflanzenmaterials beeinflusst, dennoch sind andere Faktoren wie z.B. morphogenetische, ontogenetische, diurnale und klimatische Faktoren nicht zu vernachlässigen. Da Kamille nicht durch Stecklinge vermehrt werden kann, besteht immer das Risiko, dass eine anfangs gute Sorte im Laufe der Jahre nachlässt.

Sorte	Ernte	Matricin (mg/g Droge)
Mabamille	2001	1.2
Mabamille	2002	0.6
Mabamille	2003	0.8
Mabamille	2004	1.0
Kirsch	2003	1.2
Kirsch	2004	0.5
Manzana	2003	1.8
Manzana	2004	1.4

Tab. 2.2: Matricingehalt verschiedener Kamillensorten.

2.2 Quantitative Bestimmung von Matricin

Die Gehaltsbestimmung von Matricin ist zum einen durch direkte Quantifizierung des Proazulens möglich, zum anderen kann auch eine indirekte Bestimmung über sein Abbauprodukt Chamazulen vorgenommen werden. Das letztere Verfahren ist weit verbreitet.^{38,39}

Saberi (1990)⁴⁰ hat zur Bestimmung der Proazulene in Schafgarbe und Kamille zunächst eine Abbaureaktion des Proazulens mit Schwefelsäure vorgeschlagen. Das entstehende Chamazulen wird durch Sublimation vom Probenmaterial abgetrennt und gaschromatographisch bestimmt. Soyke (1991)⁴¹ überprüfte die Quantifizierung des Matricins über dessen Zerfallsprodukt Chamazulen und stellte fest, dass diese Methodik nicht geeignet ist, weil die Zersetzung von Matricin zu Chamazulen unvollständig erfolgt und zudem die Konversionsrate vom Matricinausgangsgehalt abhängig ist.

Einen guten Überblick über mögliche Verfahren zur Analytik von Sesquiterpenen und Sesquiterpenlactonen gibt Merfort (2002).⁴²

Ghassemi (1988)³¹ stellte zuerst eine matricinspezifische HPLC-Methode vor; dadurch war die Bestimmung von Matricin in Vielstoffgemischen möglich, wie beispielsweise Kamillenblüten und -extrakten. Die HPLC-Methode wurde von Soyke (1991)⁴¹ bezüglich Trennleistung und Analysenzeit weiterentwickelt, sowie von Ness (1995)³² modifiziert, so dass eine Bestimmung von Matricin und En-In-Dicycloethern aus Kamillenextrakten in einem Lauf möglich war. Die Detektion erfolgte jeweils per UV. Matricin hat ein Absorptionsmaximum bei 244 nm, was auf die Carbonylgruppe und die weiteren Doppelbindungen im Molekül zurückzuführen ist.

2.2.1 Bestimmung von Matricin in Drogenmatrices und Extrakten

Dünnschichtchromatographie zur quantitativen Bestimmung von Stoffen direkt auf den Kieselgelplatten nach der Trennung ist durch verschiedene Auswertegeräte (DC-Scanner) möglich, welche die Absorption, Fluoreszenz oder Radioaktivität in Abhängigkeit vom Ort auf der Platte durch linearen oder Zick-Zack-Scan messen können.^{43,44}

Dieses Verfahren wurde zur In-situ-Messung folgender Kamilleninhaltsstoffe benutzt: Cumarine, Bisabolol, Chamazulen und En-In-Dicycloether.^{3,45}

Diese Methode ist im Gegensatz zur HPLC schneller und erfordert einen geringeren Geräte- und Lösungsmiteileinsatz.

Mit dem DC-Scanner Shimadzu CS-930 wiesen wir Matricin qualitativ durch die Aufnahme der Remissionsortskurve nach. Die quantitative Auswertung erfolgt über die Eichkurve. Diese Methode wurde auch bei den pharmakokinetischen Untersuchungen von Matricin angewendet (s. 4.2).

Abbildung (2.9a) zeigt die Remissionsortskurve und (2.9b) das Chromatogramm des Matricins auf der DC-Platte, aufgenommen mit DC-Scanner.

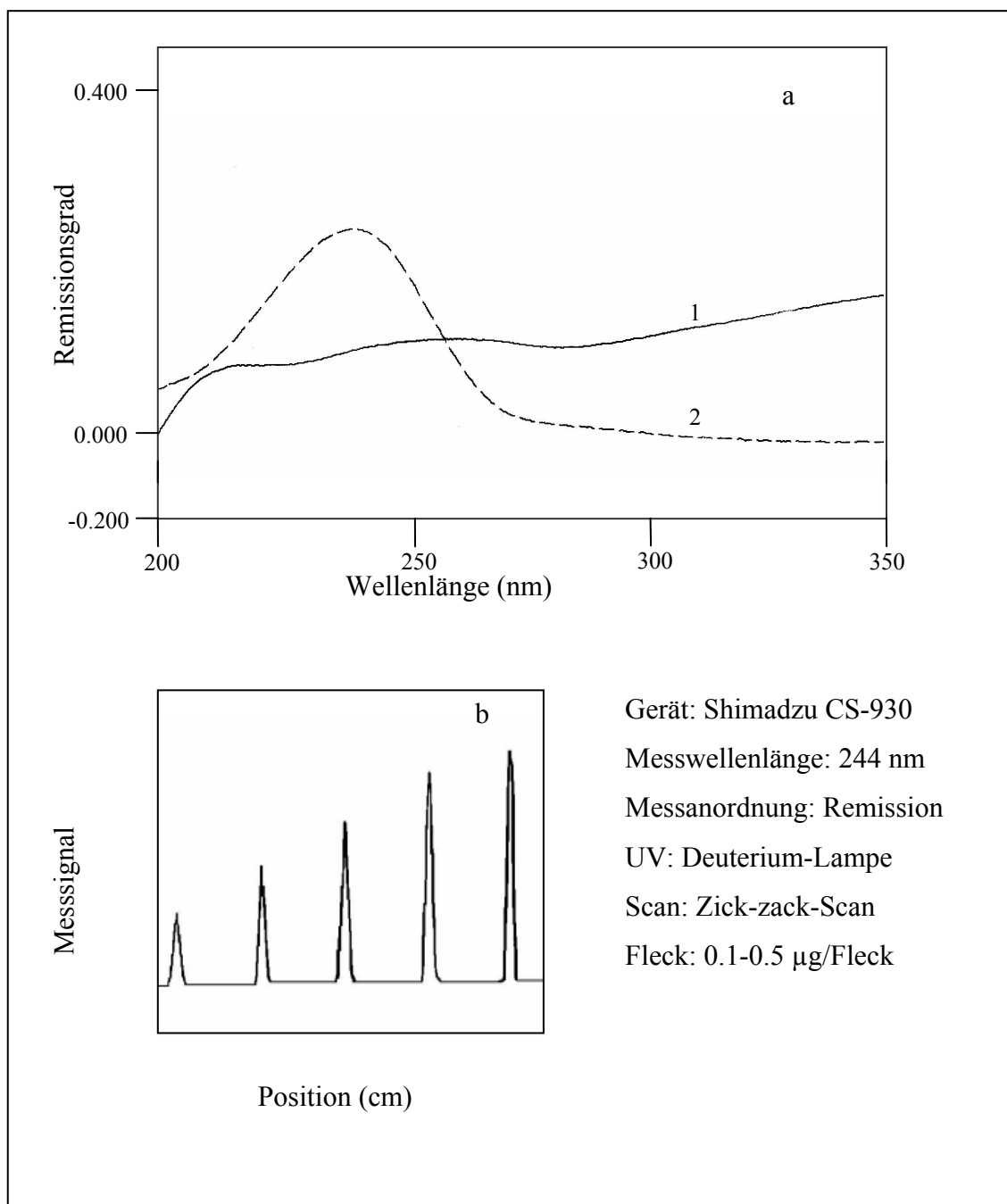


Abb. 2.9a: Remissionsortsspektrum von Matricin auf Kieselgel 60 F₂₅₄. 1. Blindspektrum 2. Matricinspektrum (5 µg/Fleck).

Abb. 2.9b: In-situ-Messung von Matricin nach Entwicklung auf DC-Platten, Kieselgel 60 F₂₅₄.

2.2.2 Kalibrierung der Methode

Die Kalibrierung stellt einen mathematischen Zusammenhang zwischen den vorgegebenen Standardsubstanzkonzentrationen und den erhaltenen Messgrößen dar, im Falle des DC-Scanners den Flächen oder Höhen der Messsignale. Bei den meisten Analyseverfahren besteht ein linearer Zusammenhang. Die Ermittlung der wahrscheinlichsten Kalibriergeraden erfolgt durch lineare Regression nach der Methode der Minimierung der Summe der quadrierten Abweichungen.⁴³ Die Kalibrierung beginnt mit der Wahl des vorläufigen Arbeitsbereiches. Die Bereichsmitte soll mit der am häufigsten zu erwartenden Probenkonzentration übereinstimmen. Gleichzeitig sollen die Konzentrationen der Kalibrierlösungen äquidistant verteilt sein. Jede Kalibrierfunktion ist nur innerhalb des festgelegten Arbeitsbereiches gültig. Eine Extrapolation der Geraden ist nicht zulässig.⁴⁶

Die Größe des Messsignals der densitometrischen Auswertung hängt nicht nur von der Art und Menge der Substanz ab, sondern auch von den chromatographischen und Auswertebedingungen. Um die chromatographischen Einflussfaktoren herabzusetzen, die von Platte zu Platte schwanken, sollte auf jeder Platte eine bestimmte Anzahl von Standards mitchromatographiert werden. Die Auswertung erfolgt über die Regressionslinie der Peakintegrale (Fläche unter der Kurve, AUC) von Matricin-Standard in einem Bereich 0.1-0.5 µg/Fleck. Die Kalibrierdaten von Matricin, die mittels Microsoft Excel berechnet wurden, zeigt Tabelle 2.3.

2.2.3 Validierung der Methode

Mit Hilfe der Validierung soll die Eignung und Zuverlässigkeit eines Untersuchungsverfahrens nachgewiesen und dokumentiert werden. Sie leistet damit einen wesentlichen Beitrag zur Qualitätssicherung von Arzneimitteln.

Art und Umfang der Validierungsschritte sind jeweils abhängig vom analytischen Problem. Genaue Definitionen und Erläuterungen zu den Validierungsparametern stehen im Zusammenhang mit der HPLC-Methode (s. 4.3.2).

2.2.3.1 Präzision

Die Präzision wurde bei wiederholtem manuellem Auftragen von 1 µl unterschiedlicher Konzentrationen der Matricinlösungen untersucht. Die Präzision eines Verfahrens kann durch die relative Standardabweichung (% S) erfasst werden. Die Standardabweichung charakterisiert die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert.

Für Remissionsmessungen ist mit einer relativen Standardabweichung bis zu 2% zu rechnen und für Transmissionsmessungen bis zu 4%.⁴⁷ Die Daten der Präzision sind in Tabelle 2.4 zusammengestellt.

Die relativen Standardabweichungen schwanken zwischen 1.9 und 3.1%. Das ist durch die Instabilität des Matricins, das sich auf der Kieselgelplatte während des Scannens zersetzen kann, zu erklären. Die Stabilität des Matricins in Lösung ist ebenfalls begrenzt. Ein nochmaliges Scannen der Flecke auf einer Platte ist zu vermeiden. Wegen der Zersetzung des Matricins während der längeren Scanzeiten erhöht sich die relative Standardabweichung pro Fleck auf 5-8%.

Parameter	Werte
Messbereich (mg/100ml)	10-50
Auftragsvolumen	1 µl
Anzahl der Messpunkte pro Konzentration	3
Korrelationskoeffizient (R^2)	0.9976
Regressionsgerade	$Y = 0.1157 \cdot 10^4 X + 0.5819 \cdot 10^4$

Tab. 2.3: Daten der Kalibrierung der DC-Scanner-Methode von Matricin.

Matricinsmenge (µg/Fleck)	Messsignal-Mittelwert (AUC)	% S
0.10	16.8*10 ³	3.0
0.20	19.2*10 ³	2.6
0.30	27.3*10 ³	3.1
0.40	37.0*10 ³	2.3
0.50	45.5*10 ³	1.9

Tab. 2.4: Daten zur Präzision der DC-Scanner-Methode von Matricin bei wiederholtem Auftragen (n = 6).

2.2.3.2 Die Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste nachweisbare Menge, die nur mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0.5$ vom Blindwert zu unterscheiden ist.⁴³

Sie liegt bei einer Matricinmenge von 0.03 µg pro Fleck.

2.2.3.3 Die Bestimmungsgrenze

Sie ist die kleinste quantifizierbare Menge, die sich mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 0.998$ vom Blindwert unterscheidet, so dass 99.8% aller Messwerte erkannt werden.⁴³ Die Bestimmungsgrenze ist 0.05 µg/Fleck.

2.3 Zusammenfassung

Matricin gehört zu den antiphlogistisch wirkenden Inhaltsstoffen der Kamille. Obwohl die Isolierung von Matricin in der Literatur mehrfach beschrieben worden ist, gilt sie nach wie vor als schwierig.



Abb. 2.10: 2 g kristallines Matricin

Die Vorgehensweise von Stahl wurde von uns verändert, um die kritischen Schritte, die hohe Verluste an Matricin mit sich bringen, zu verbessern und die zeitaufwändigen und mit hohem Materialverbrauch verbundenen Schritte zu optimieren.

Durch die Behandlung des Chloroformextrakts mit Methanol konnte, verglichen zu der mit Petrolether, ca. 60% des Extrakts ohne detektierbare Matricinverluste abgetrennt werden. Das ist mit der besseren Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln zu erklären.

Durch Säulenchromatographie wird der behandelte Extrakt weiter gereinigt. Die gesammelten matricinreichsten Fraktionen mehrerer Säulen können für die Ausschüttelung vereinigt werden. Nach der Auskristallisation werden Matricinkristalle von 90% Reinheit erhalten. Eine direkte Auskristallisation nach Säulenchromatographie liefert zu 75% reine, gelbe Matricinkristalle.

Zur Gewinnung rein weißer Matricinkristalle wird über eine Al_2O_3 -Säule chromatographiert. Matricin, eine Substanz von mittlerer Polarität, ist sehr schwierig zu kristallisieren, und die Kristallisation gelingt nicht immer. Aus dem methanolischen Extrakt konnten jedoch Kristalle erhalten werden.

Zur quantitativen Bestimmung wird eine In-situ-Methode entwickelt, die für die verwendeten Zwecke ausreichend präzise ist.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, 2 g zu 90% reines Matricin zu gewinnen (Abb. 2.10).

Kapitel 3

Chamazulencarbonsäure

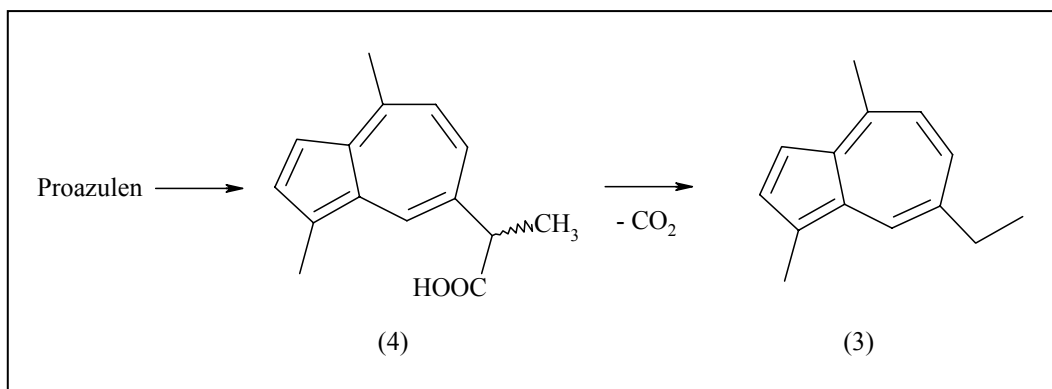


Abb. 3.1: Abbau eines Proazulens zum 5-Ethyl-3,8-dimethylazulen (Chamazulen) (3) über 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)propionsäure (Chamazulencarbonsäure) (4) als Zwischenstufe.

Chamazulencarbonsäure (4), (\pm)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)propionsäure, ist ein Abbauprodukt von Proazulenen (Abb. 3.1). Proazulen-Sesquiterpenlactone kommen in verschiedenen Asteraceen, besonders *Matricaria recutita* L. und *Achillea millefolium* L., vor. Das nativ im ätherischen Öl der Pflanzen enthaltene Proazulen geht bereits während der Wasserdampfdestillation in Chamazulencarbonsäure (4) über; diese ist aber kein beständiger Inhaltsstoff des Öls. Sie wird weiter zum Chamazulen (3) transformiert, das dem ätherischen Öl seine blaue Farbe verleiht. Die Isolierung von (4) erfolgt nach dem von Goeters an *Achillea millefolium* L. optimierten Verfahren.¹¹ Die Beschreibung des pflanzlichen Materials und weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von (4) im Bezug auf Enantiomerenreinheit, pflanzenphysiologische Wirkung und Synthese von Azulenderivaten werden im folgenden behandelt.

3.1 Pflanzliches Material

3.1.1 Die Gemeine Schafgarbe, *Achillea millefolium* L. s. l., Asteraceae

Achillea millefolium L. s. l. ist eine zytogenetisch und chemisch polymorphe Sammelart, die in Europa, Nordamerika und Nordasien heimisch ist.

Die Schafgarbe ist eine ca. 70 cm hohe Staude mit charakteristischen, langschmalen, mehrfach fiederteiligen Blättern. Die kleinen Blütenköpfchen sind in Doldenrispen angeordnet und bestehen aus trockenhäutigen Hüllkelchblättern, weißen oder rosa Zungenblüten und gelben Röhrenblüten. Auf dem Blütenstandsboden sind schmale Spreublätter vorhanden (Abb. 3.2).²⁶

Bereits Dioscurides (1. Jh. n. Chr.) erwähnte die Schafgarbe in seiner „Materia Medica“ aufgrund ihrer blutungsstillenden und entzündungshemmenden Wirkung. Im Mittelalter bzw. in der Frühen Neuzeit wird die Schafgarbe – zumeist *Millefolium* oder Garb genannt – von zahlreichen Autoren beschrieben, so z.B. von der hl. Hildegard von Bingen, von Brunfels, Leonhart Fuchs und Lonicerus.⁴⁸

Heute ist die Schafgarbe eine sowohl in der europäischen Volksheilkunde als auch in der wissenschaftlichen Phytotherapie anerkannte Medizinalpflanze. Sie wird als Teeaufguss oder in Fertigpräparaten als Antiphlogistikum, Spasmolytikum, Stomachikum, Karminativum und Chologogum eingesetzt.²⁵ Abgesehen von der choleretischen Wirkung deckt sich der Anwendungsbereich mit dem der Kamillenblüten, was sich auf ähnliche Inhaltsstoffe zurückführen lässt, wie auf Flavonoide, Polyine, Cumarine und u. a. auf die antiphlogistisch wirksamen Sesquiterpene und Chamazulen, welches im Destillat von *Millefolii herba* ein wichtiges Wirkprinzip darstellt. Die Droge enthält 0.2 bis über 1% ätherisches Öl. Das Deutsche Arzneibuch DAB 10 fordert einen Mindestgehalt von 0.2% und einen Mindestgehalt an Proazulenen von 0.02%, berechnet als Chamazulen. Je nach Ploidie ist Schafgarbe azulenfrei oder enthält bis zu 25% Chamazulen.⁴⁹

Zur Isolierung von Chamazulencarbonsäure (2) aus *Achillea millefolium* L. wurde *Achillea collina* BECKER „PROA“ (für **Pro**azulenreich) aus Ernten der Jahre 2000, 2001, 2002 und 2003 aus einem Anbaugebiet in Thüringen, Deutschland verwendet. Die Proazulen enthaltenden Blüten wurden von der getrockneten Pflanze (*Millefolii herba*) vor jeder Extraktion von Hand abgetrennt.



Abb. 3.2: *Achillea millefolium* L., Asteraceae.²⁶

3.1.2 *Stevia serrata* Cav., Eupatorieae

Die Gattung *Stevia* gehört zum Tribus Eupatorieae und Subtribus Ageratinae der Asteraceae. Sie ist im Südwesten der Vereinigten Staaten bis nach Zentral-Argentinien verbreitet, mit Ausnahme der Amazonas-Region.⁵⁰

Obwohl die Inhaltsstoffe der Gattung *Stevia* nicht uniform sind, handelt es sich bei den sekundären Stoffen hauptsächlich um Sesquiterpenlactone, Diterpene und Longipinene.⁵¹⁻⁵³

Das hier verwendete Pflanzenmaterial (40 g getrocknete Blüten; Ernte 2002) wurde in den Santa Rita Mountains in Arizona, USA gesammelt.

3.2 Extraktion von *Achillea millefolium* L.

Achillea collina BECKER „PROA“ ist ein tetraploides Kultivar von Schafgarbe, die auf hohen Proazulengehalt gezüchtet wurde. Die hauptsächlich auftretenden Proazulene sind 8 α -Acetoxyartabsin (Achillicin) (5), 8 α -Angeloxyartabsin (6), 8 α -Tigloxyartabsin (7) und 8-Desacetyl-4-epi-matricin (8),⁵⁴ deren Abbau S-Chamazulencarbonsäure (2) liefert (Abb. 3.3).¹¹

Unterschiedliche Ernten des Kultivars wurden nach der zur Gewinnung von Chamazulencarbonsäure (2) optimierten Methode extrahiert,¹¹ nachdem die Droge vom Stängelanteil (etwa 43 Gew.%) befreit wurde. Bis zur Bearbeitung wurde die Droge bei - 80 °C gelagert. Die Ausbeuten sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Die Droge aus der Ernte des Jahres 2000 war geschnittenes Kraut, das zwei Jahre lang gelagert wurde. Die erzielte Ausbeute war gering, wohl verursacht durch die Zersetzung von Proazulenen beim Lagern.

Denselben Effekt hat man nach Lagerung von *Artemisia absinthium* L. auf den Artabsingehalt festgestellt.⁵⁵

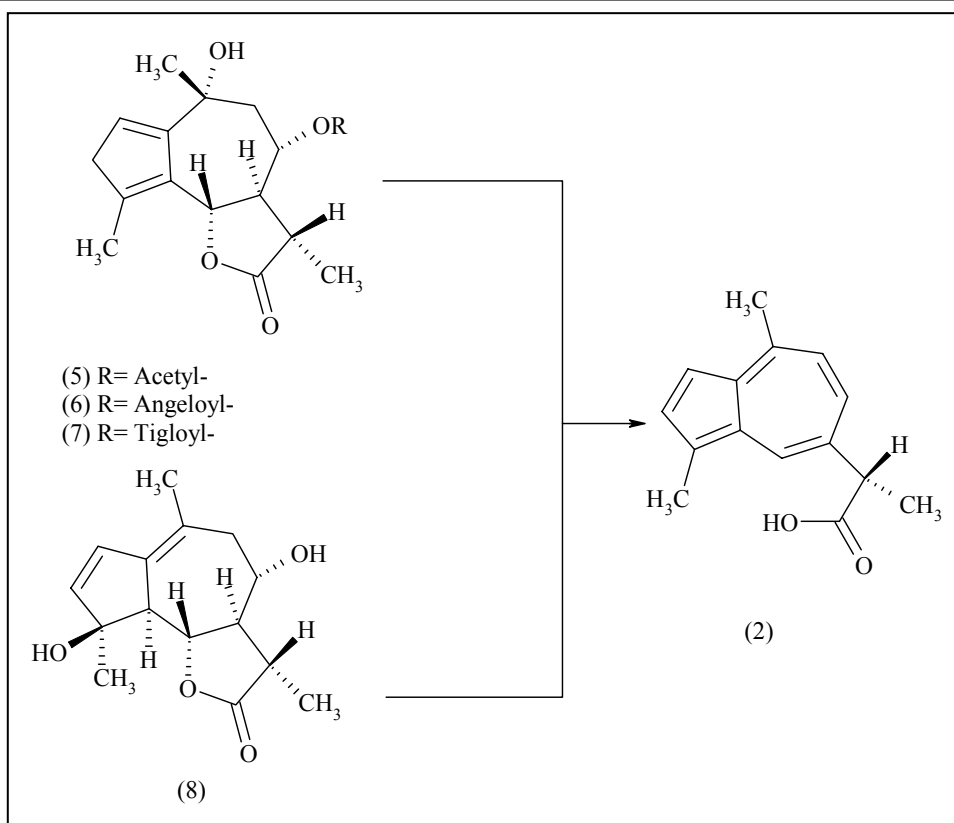


Abb. 3.3: Abbau von 8 α -Acetoxyartabsin (Achillicin) (5), 8 α -Angeloxartyabsin (6), 8 α -Tigloxyartabsin (7) und 8-Desacetyl-4-epi-matricin (8) zu S-Chamazulencarbonsäure (2).

Ernte	% Ausbeute
2000	< 0.02
2001	0.35
2002	0.34
2003	0.32

Tab. 3.1: % Ausbeute bezogen auf Blütenanteil an Chamazulencarbonsäure (2) extrahiert aus je 250 g *A. collina*.

3.3 Extraktion von *Stevia serrata* Cav.

Wir haben die Literatur nach Sesquiterpenen durchsucht, die zu Chamazulencarbonsäure abgebaut werden können und am Asymmetriezentrum die umgekehrte Konfiguration aufweisen wie Chamazulencarbonsäure aus *Achillea* und *Matricaria*. Bei dieser Recherche stießen wir auf *Stevia serrata* Cav., die Proazulene enthält, deren Abbau R-Chamazulencarbonsäure (9) liefern würde. Die Proazulene sind Christinin (10)⁵² – ein Epoxyguaianolid – und zwei weitere Sesquiterpenlactone, nämlich Steviserrolid A (11) und B (12)⁵¹ (Abb. 3.4).

In der Tat ließ sich Chamazulencarbonsäure aus *Stevia serrata* gewinnen. Die Ausbeute bei Extraktion nach der für Schafgarbe optimierten Methode war jedoch extrem gering, und die Chamazulencarbonsäure auch nach der präparativen Dünnschichtchromatographie noch durch Fettsäuren verunreinigt. Die Detektion von Chamazulencarbonsäure in dem als grünes Öl anfallenden Produkt war nur mittels Massenspektrometrie möglich.

Als Grund dafür ist sicherlich die geringe Menge an Ausgangsmaterial (40 g Blüten) zu nennen sowie der uns unbekannte Gehalt der Proazulene, der eventuell in Abhängigkeit von der Fundstelle, dem Jahr, der Ernte usw. stark schwankt – in der Literatur ist darüber nichts zu finden. Zudem ist denkbar, dass die angewandte Methode zur Extraktion von *Stevia serrata* Cav. nicht gut geeignet ist. Der Chamazulencarbonsäure enthaltende Rohextrakt, welcher sehr empfindlich schien, wurde bei -20 °C bis zur Reinigung aufbewahrt und zersetzte sich überraschenderweise dennoch über Nacht.

Eine Abtrennung der Chamazulencarbonsäure (9) durch Überführung in den Methylester war nach Behandlung des grünen, Chamazulencarbonsäure enthaltenden Öls mit (Trimethylsilyl)-diazomethan erfolgreich und eindeutig durch die Aufnahme eines ¹H-NMR-Spektrums.⁵⁶

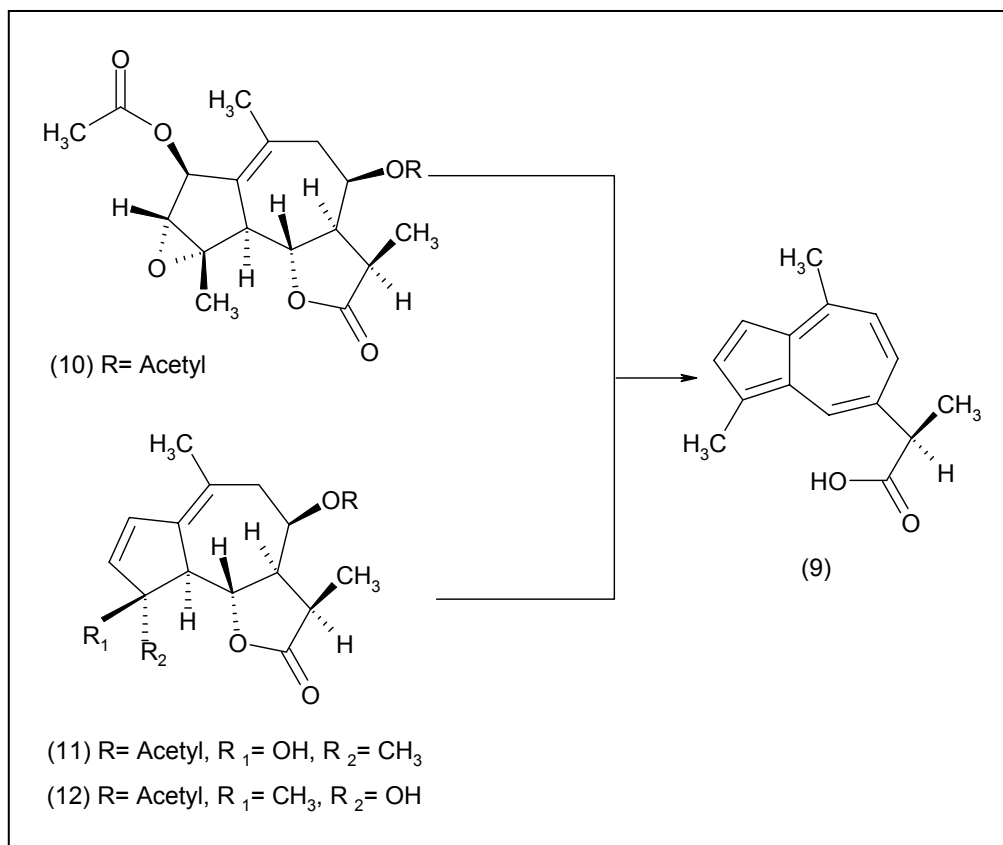


Abb. 3.4: Abbau der Stevia-serrata-Proazulene Christinin (10), Steviserrolid A (11) und Steviserrolid B (12) zu R-Chamazulencarbonsäure (9).

3.4 Untersuchung der Enantiomerenreinheit

Die aus *Matricaria recutita* L. und *Achillea millefolium* L. extrahierte Chamazulencarbonsäure (2) besitzt S-Konfiguration analog den Eutomeren einiger nichtsteroidaler antiphlogistischer wie z.B. Ibuprofen und Naproxen.⁵⁷ Es ist von großem Interesse zu klären, ob das R-Enantiomer von Chamazulencarbonsäure (9) eventuell die gleiche Wirkung oder eine andere hat. Dazu muss zuerst die Konfiguration als R-Enantiomer der Chamazulencarbonsäure (9) bestätigt werden.

3.4.1 NMR-Spektroskopie zur Enantiomerenreinheitsbestimmung

Für die direkte Enantiomerenreinheitsbestimmung per NMR-Spektroskopie gibt es im wesentlichen drei Möglichkeiten: Mit Hilfe chiraler Derivatisierungsreagenzien (Überführung in Diastereomere), mit chiralen Lanthanid-Verschiebungsreagenzien (chiral lanthanide shift reagents, CLSRs), und durch Verwendung chiraler Lösungsmittel (chiral solvating agents, CSAs).

Diastereomere Derivate oder diastereomere Komplexe weisen im Gegensatz zu Enantiomeren im NMR-Spektrum Signale mit unterschiedlichen Verschiebungen auf, da ihre diastereotopen Kerne chemisch nicht äquivalent sind und damit anisochrone Signale liefern. Die Resonanzen enantiotoper Kerne ergeben dagegen isochrone Signale. Mit dieser Methodik kann man nicht nur eine qualitative Aussage zur Enantiomerenreinheit erhalten; viel mehr erlaubt die Integration der anisochronen Signale, welche durch die Basislinie getrennt sein müssen, auch die Bestimmung der diastereomeren Zusammensetzung, welche in direkter Korrelation zum Enantiomerenverhältnis der Ausgangsverbindung steht.⁵⁸

3.4.2 NMR-Shift-Untersuchung von Chamazulencarbonsäure (9) isoliert aus *Stevia serrata* Cav.

Die Enantiomerenreinheitsbestimmung der aus *Stevia serrata* Cav. isolierten Chamazulencarbonsäure (9) wird mittels NMR-Spektroskopie des Methylesters nach Zusatz von Eu(hfc)_3 (Tris-[3-(heptafluorpropyl-hydroxymethylen)-d-camphorato]]-europium(III)) - ein chirales Lanthanid-Verschiebungsreagenz - durchgeführt.⁵⁹

Die nukleophilste Gruppe der Analysensubstanz komplexiert mit dem Lanthanid-Zentralion. Da die Liganden des Lanthanid-Verschiebungsreagenzes chiral sind, werden diastereomere Komplexe für jedes Enantiomer gebildet. Dies führt zu Unterschieden in der chemischen Verschiebung, so dass wiederum eine Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse möglich ist. Faktoren, die die Diastereomerenbildung beeinflussen und daher Beachtung verdienen, sind Konzentrationen der Untersuchungssubstanz, ihr Konzentrationsverhältnis zum chiralen Hilfsmittel und die Temperatur während der Messung.

Der Methylester wird zuerst nach Zusatz von $[\text{Eu}(\text{hfc})_3]$ ^1H -NMR spektroskopisch untersucht, um festzustellen, ob der Ester aus dem pflanzlichen Material als Racemat vorliegt; danach wird die Untersuchung weiter geführt durch Zumischen von *S*-Chamazulencarbonsäuremethylester (13) aus Schafgarbe. Detaillierte Angaben zur Durchführung und bzgl. Messparameter sind im experimentellen Teil 7.6 aufgeführt.

Abbildung 3.5 zeigt das Spektrum des Esters aus *Stevia serrata* Cav. Mit $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ resultierte keine Verdopplung der Signale (A); bei B, C und D wurde nach Zugabe des Methylesters aus Schafgarbe auch die Konzentration an $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ kontinuierlich erhöht. Man erkennt, dass alle Signale nach links verschoben werden, die Protonen also weniger abgeschirmt sind. Im Spektrum B und C sind die Signale der Protonen der Methylgruppe an C-13 bei δ 1.79 ppm, der OCH_3 -Protonen bei δ 3.91 ppm und die der CH_3 -Gruppe an C-15 bei δ 2.9 gespalten. Das Signal des Protons von C-11 ist breit und stark verschoben ($\Delta\delta > 0.5$ ppm). Die Protonen an C-6 und C-8 im aromatischen Bereich werden ebenfalls verschoben (registriert $\Delta\delta$ bis ca. 0.8 ppm). Mit erhöhter $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ Konzentration werden sie breiter, so dass keine Aufspaltung zu erkennen ist.

Die Daten aus den ^1H -NMR Spektren verdeutlichen, dass *Stevia serrata* Cav. eine enantiomerenreine Chamazulencarbonsäure mit *R*-Konfiguration aus den enthaltenden Proazulen liefert. Die Ausbeute an extrahierter *R*-Chamazulencarbonsäure (9) aus *Stevia serrata* Cav. war jedoch zu niedrig, um einen in-vitro-Test zur Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität durchführen zu können.

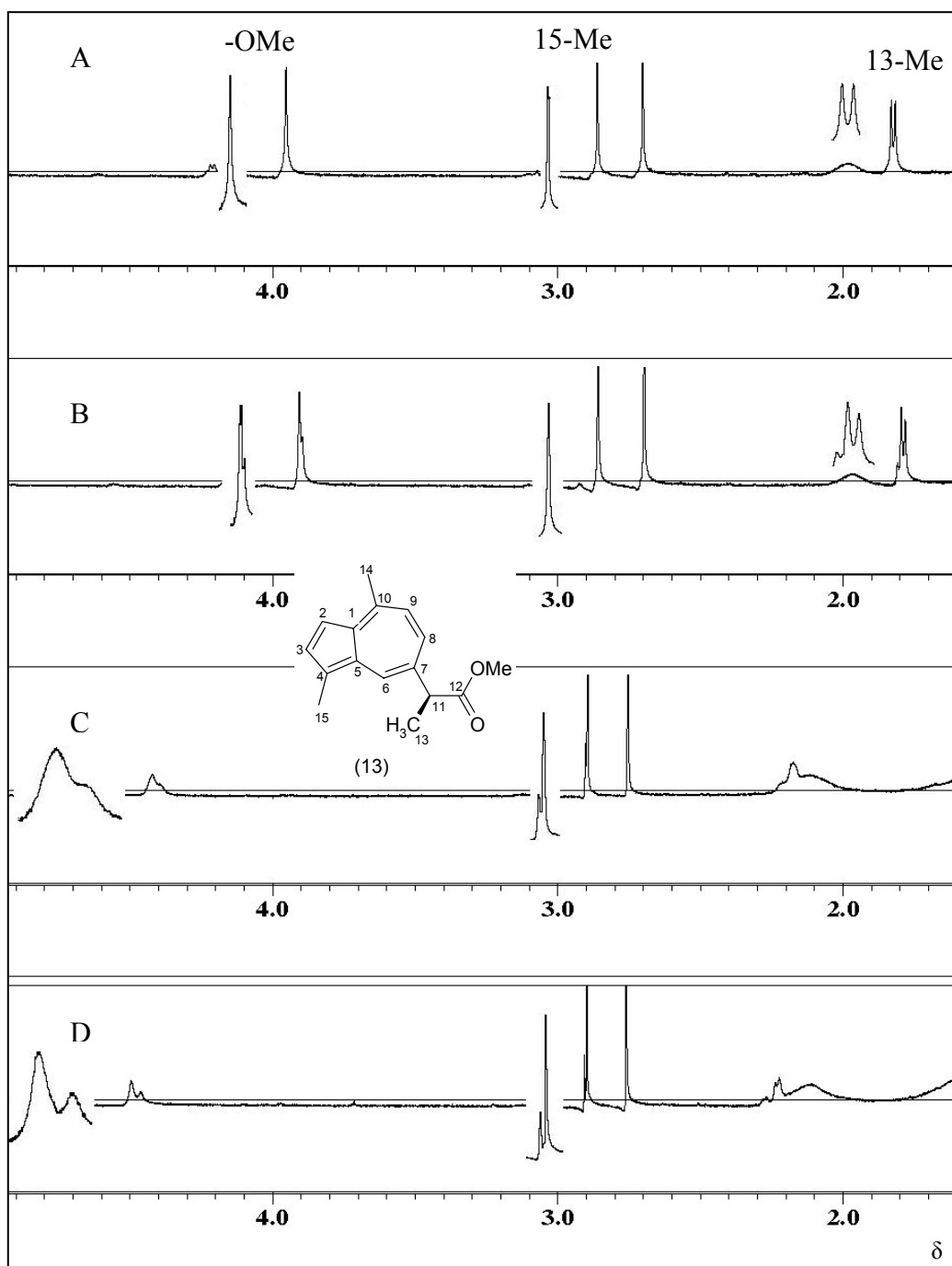


Abb. 3.5: A: 500MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Chamazulencarbonsäuremethylester aus *Stevia serrata* Cav. in Gegenwart von $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ in $\text{CDCl}_3/\text{CCl}_4$. B: Spektrum des Gemisches nach Zugabe von S-Chamazulencarbonsäuremethylester (13) gewonnen aus *Achillea collina* L. C, D: Spektren des Gemisches nach Erhöhen der Konzentration von $\text{Eu}(\text{hfc})_3$. Die auftretenden Spaltungen der Signale sind vergrößert.

3.5 Auxinwirkung der Chamazulencarbonsäure

Zu den Auxinen rechnet man sowohl die natürlich vorkommenden als auch die synthetisch hergestellten organischen Wirkstoffe, die in niedrigen Konzentrationen ($<10^{-6}$ M) das Streckungswachstum von Sprossen fördern und das Längenwachstum der Wurzeln hemmen. Auxine sind demnach primär nicht nach ihrer chemischen Struktur, sondern nach ihrer Wirkung definiert. Zu den zahlreichen synthetischen Verbindungen zählen Indolderivate, Phenylelessigsäure und Naphthylelessigsäure. β -Indolylessigsäure (14) gilt als der wichtigste, verbreitetste und natürliche Vertreter dieser Klasse.⁶⁰

Besonders charakteristisch für diese Verbindungen sind eine nicht kernständige Carboxylgruppe, ein aromatisches Ringsystem, sowie Oberflächenaktivität, resultierend aus einem gewissen Gleichgewicht zwischen hydrophilen und lipophilen Teilen des Moleküls; weiterhin eine bestimmte räumliche Anordnung zwischen dem Ringsystem und der Carboxylgruppe in der Seitenkette. Da Chamazulencarbonsäure (2) diesen Anforderungen weitgehend zu entsprechen schien, wurde deren Auxinwirkung in einem Testsystem untersucht. Goeters stellte in einem ABP-Bindungsassay (ABP= Auxin-bindenden Protein) fest, dass Chamazulencarbonsäure (2) eine Affinität zum Auxin-bindenden Protein I – einem Rezeptor der Auxine – aufweist, die nur 10fach geringer war als die des starken Auxins 1-Naphthalinessigsäure 1-NAA (15).¹¹ (Abb. 3.6)

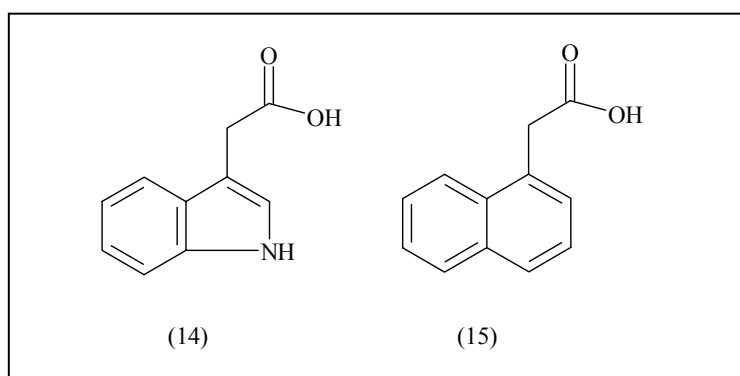


Abb. 3.6: Auxine: β -Indolylessigsäure (14) und 1-Naphthalinessigsäure (15).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zweiter Assay angewendet. Dieser Bioassay basiert auf der Ethylenproduktion aus Erbsen-Internodien. Die Internodien wurden in einer Lösung in versiegelten Flächen inkubiert. Enthält die Lösung ein Auxin, z.B. 1-Naphthalinessigsäure (15), so bildet sich Ethylen, das durch GC aus dem Gasraum der Flächen bestimmt wurde. Die Zugabe einer als Anti-Auxin wirkenden Substanz vermindert die Ethylenproduktion. Dadurch wird die Auxin- und Anti-Auxinwirkung bestimmt. Der Test wird auf Chamazulencarbonsäure (2) angewendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt.

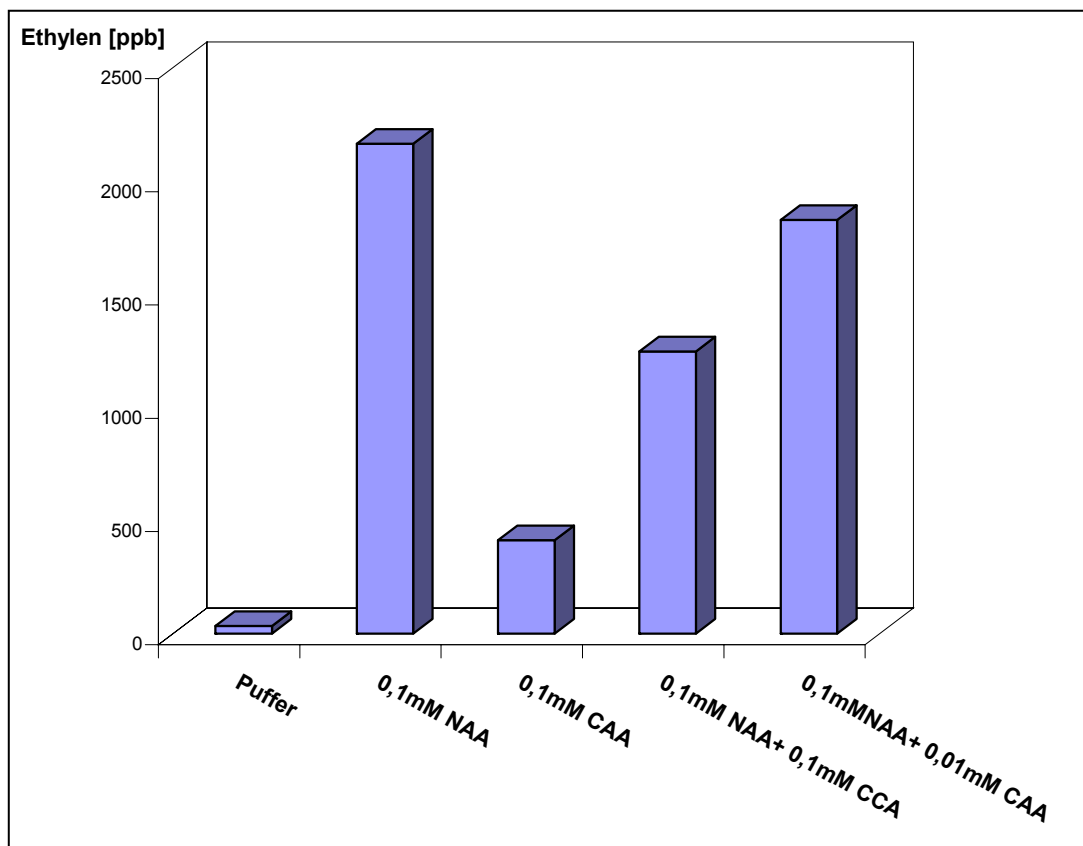


Abb. 3.7: Effekt von NAA (15) und CCA (2) auf die Ethylenproduktion.

Daraus wird deutlich, dass – verglichen mit der Kontrolle – Chamazulencarbonsäure (2) die Ethylenproduktion erhöht. Sind beide Substanzen gleich konzentriert (je 0.1 mM) in dem System vorhanden, so vermindert Chamazulencarbonsäure die Ethylenproduktion durch NAA (15). Bei einem Konzentrationsverhältnis 0.1 mM NAA/0.01 mM (2) steigt die Ethylenproduktion wieder.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Chamazulencarbonsäure (2) die Funktion eines Auxins haben könnte. Sie wirkt als Anti-Auxin, wenn sie mit dem Standard Auxin NAA (15) getestet wird.

Wegen der Strukturähnlichkeit beider Substanzen konkurrieren sie um die Rezeptorbindestelle. (2) hat eine geringere Affinität zu den Rezeptoren als NAA (15); daraus resultiert eine milde kompetitive Hemmung, was der Reduktion der Ethylenproduktion entspricht.

Diese Ergebnisse bestätigen die eingangs geschilderten Vermutungen und stimmen mit der Ergebnissen des ABP-Bindungsassays überein.

3.6 Azulenderivate

3.6.1 Versuche zur Synthese von Chamazulencarbonsäure (4)

Ausgehend vom racemischen, primären Alkohol (18) sollte versucht werden, racemische Chamazulencarbonsäure (4) zu gewinnen und durch nachfolgende Enantiomerentrennung die gewünschte R-Chamazulencarbonsäure (9) in größerer Menge für pharmakologische Tests zu erhalten, nachdem die Isolierung aus *Stevia serrata* zu wenig Material geliefert hatte.

Erstes Synthesziel war deswegen die Synthese des Alkohols (18), um anschließend die Bedingungen für dessen Oxidation zu Chamazulencarbonsäure (4) herauszufinden.

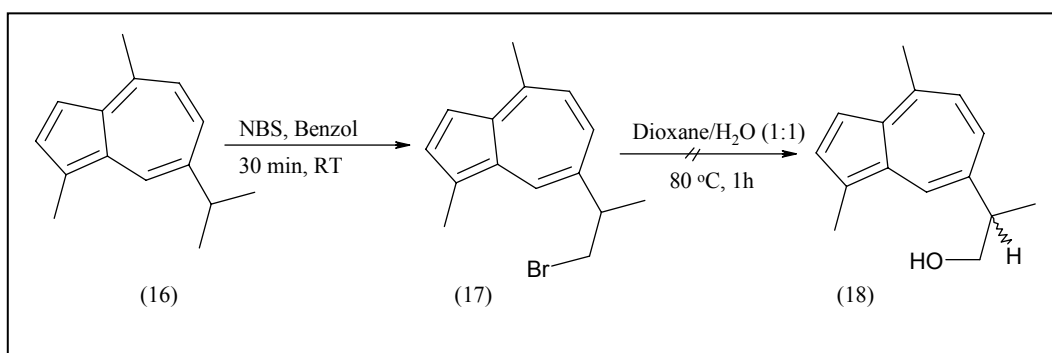


Abb. 3.8: Die Synthese von 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (18) nach Hydrolyse von 7-(2-Bromo-1-methylethyl)-1,4-dimethylazulen (17), das durch Behandlung von 7-Isopropyl-1,4-dimethylazulen (16) mit NBS entstanden ist.

Als vielversprechendes Ausgangsprodukt zur Gewinnung des Alkohols (18) erschien das 7-(2-Bromo-1-methylethyl)-1,4-dimethylazulen (17). Dessen Synthese gelang Nozoe et al. (1991).⁶¹ Die Behandlung von Guaiazulen (16) mit N-Bromsuccinimid (NBS) in Benzol lieferte in 30% Ausbeute das 7-(2-Bromo-1-methylethyl)-1,4-dimethylazulen (17). Dieses war bereits 1984 als blauer Farbstoff eines Seetiers aus der Familie der Paramuriceidae identifiziert worden.⁶²

Die Hydrolyse des in der Seitenkette bromierten Guaiazulens (17) sollte laut Angaben der Literatur zur Zielverbindung (18) mit primärer Alkoholfunktion führen (s. Abb. 3.8).

Nach einstündiger Hydrolyse bei 80 °C in einer Dioxan/Wasser-Mischung (1:1) wurde in 95% Ausbeute ein Produkt erhalten, dessen spektroskopische Daten aber nicht mit der Konstitution (18) in Einklang standen. Eine detaillierte Analyse der Spektren des erhaltenen Hydrolyseproduktes führte zu dem Schluss, dass anstelle von (18) der konstitutionsisomere Alkohol (19) entstanden war.

Daneben gelang auch ein chemisch geführter Beweis für diese Annahme. Dazu wurde Chamazulencarbonsäuremethylester (13) nach Stahl mit Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether reduziert⁶³ und die spektroskopischen Daten des Reduktionsproduktes (20) (Ausbeute: 97%) mit denen des Hydrolyseproduktes von (17) verglichen.

Am Anfang dieser Untersuchung standen Massenspektroskopie und IR sowie die üblichen NMR-spektroskopischen Messungen, d.h. ¹H-NMR und ¹³C-NMR sowie ¹H,¹³C-COSY-Spektren.

Das 2D ¹H,¹³C-COSY-Spektrum von (20) erlaubt die Zuordnung aller Kerne im aliphatischen Bereich (s. Abb. 3.9). Das am stärksten verschobene Signal dieses Bereichs bei 68.96 ppm lässt sich C-12 zuordnen, welches laut ATP-Spektrum mit einem CH₂ korreliert.

Das 2D ¹H,¹³C-COSY-Spektrum von (19) erlaubt die Zuordnung von C-13 und C-11 sowie C-14 und C-15 im aliphatischen Bereich (s. Abb. 3.10).

C-12 ist das stark tieffeld verschobene Signal bei 69.64 ppm, welches dem Signal von (-CHOH-) entspricht (s. Tab. 3.2).

Die spektroskopischen Daten in Tab. 3.2 belegen, dass das Hydrolyseprodukt von (17) der sekundäre Alkohol (19) ist. Das Reduktionsprodukt von (13) dagegen ist der bei der Hydrolyse erwartete, aber nicht entstandene primäre Alkohol (20).

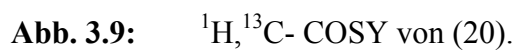


Abb. 3.9: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY von (20).

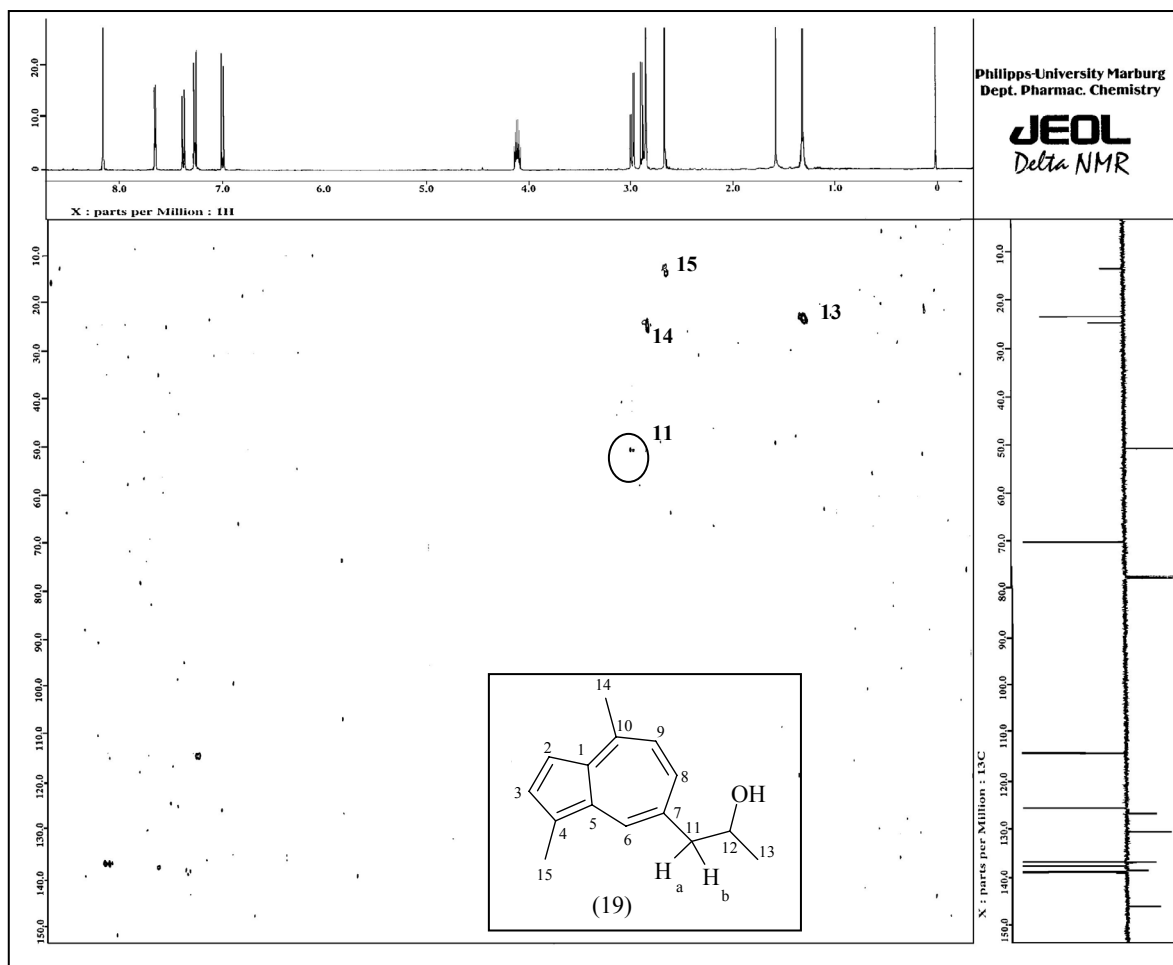


Abb. 3.10: ^1H , ^{13}C - COSY von (19).

Verbindung	11-H, C-11	12-H, C-12	13-H, C-13
(20)	11-H, sext, 3.09, 1H, $^2J = 7.1$ Hz. C-11 bei 46.17	12-H, d, 3.78, 2H, $^2J =$ 7.1 Hz. C-12 bei 68.96	13-H, d, 1.35, 3H, $^2J = 7.1$ Hz. C-13 bei 18.41
(19)	11-H, 2dd, 2.87, 2.94, 2H, $^2J_{11a,11b} = 13.3$, $^3J_{11a,12} = 8$, $^3J_{11b,12} =$ 4.6 Hz. C-11 bei 50.12	12-H, m, 4.10, 1H, 2J $= 6.2$ Hz. C-12 bei 69.64	13-H, d, 1.26, 3H, 2J $= 6.2$ Hz. C-13 bei 22.75

Tab. 3.2: Charakteristische ^1H - und ^{13}C -Signalverschiebungen der Konstitutionsisomere (19) und (20) (ppm) in CDCl_3 .

Zur Beantwortung der Frage, weshalb bei der Hydrolyse des Alkylbromids (17) der sekundäre Alkohol (19) entsteht, wurden verschiedene Möglichkeiten in Erwägung gezogen:

Eine Umlagerung des primären Alkohols (20) in den sek. Alkohol (19) während der Hydrolyse kann ausgeschlossen werden (s. Abb. 3.11). Denn (20) erweist sich unter den Hydrolysebedingungen, die aus (17) zu (19) führen, als stabil. Weitere Experimente zeigen, dass auch während des Umkristallisierens von (20) aus n-Hexan keine Umlagerung eintritt. Beide Alkohole erwiesen sich bei Aufbewahrung in Hexan als stabil.

Eine Umlagerung während der Chromatographie beider Alkohole über Kieselgel kann auch ausgeschlossen werden.

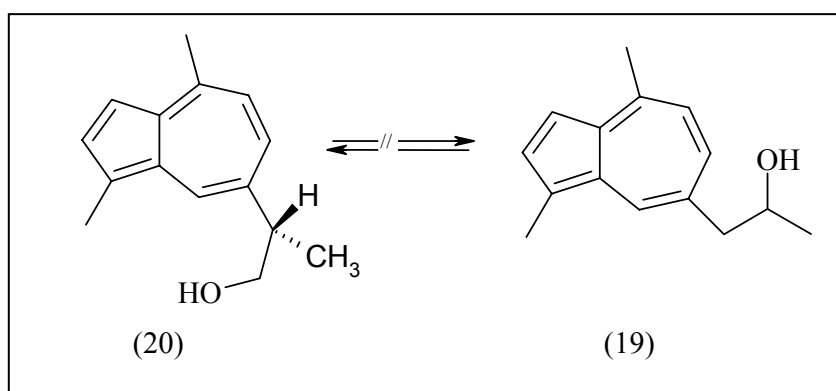


Abb. 3.11: Eine Umlagerung von (20) zu (19) während der Hydrolyse, Chromatographie und des Umkristallisierens ist ausgeschlossen.

Es erscheint plausibel, dass das Alkylbromid (17) durch Nachbargruppen-Beteiligung des Azulensystems ein verbrücktes Carbokation (17a) bildet. Daraus könnten unter Ringöffnung zwei Carbeniuminonen (17b) und (17c) entstehen, von denen das stabilere sekundäre Carbokation (17c) durch Reaktion mit dem OH-Nukleophil zu (19) reagiert. Daneben ist auch möglich, dass das OH-Nucleophil bevorzugt den Methyl-substituierten Dreiringkohlenstoff angreift unter ausschließlicher Bildung vom sekundären Alkohol (19) (s. Abb.3.12).

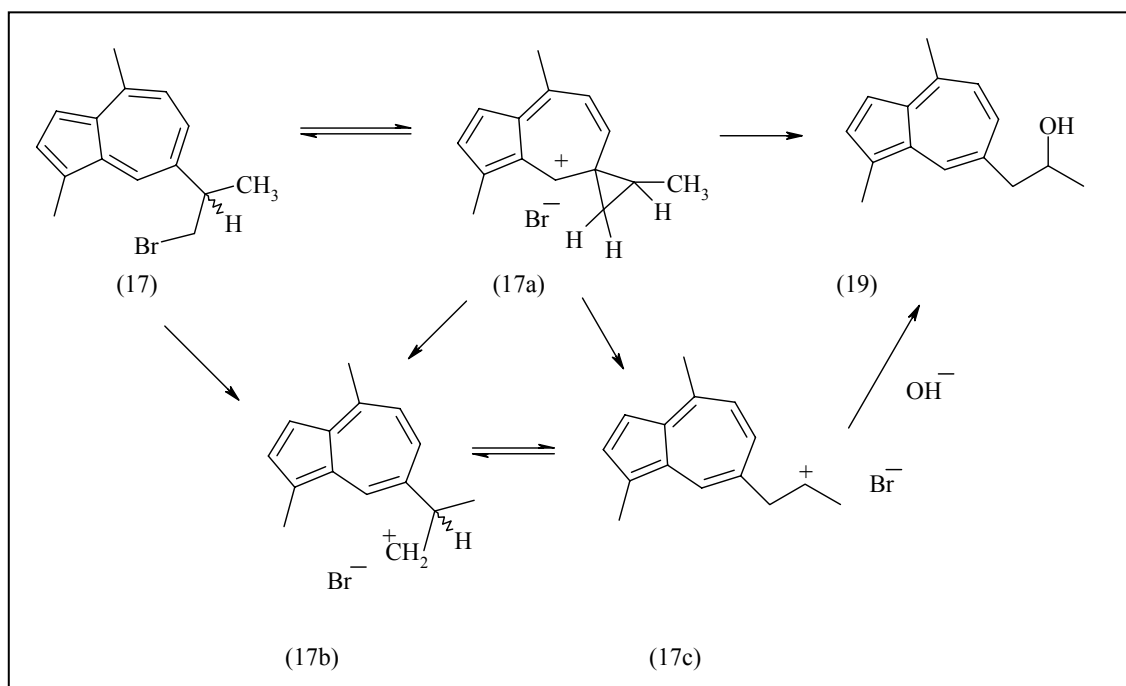


Abb. 3.12: Mögliche Mechanismen zur Entstehung von (19) aus (17).

Eine alternative Erklärung wäre die Annahme einer Wagner-Meerwein-Umlagerung. Dabei handelt es sich um eine Dissoziation im Sinne einer $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktion zu Kation (17b), das sich unter Wanderung des Azulenrestes in das sekundäre Carbeniumion (17c) umwandelt. Dieses wird vom OH-Nucleophil zu (19) abgefangen (s. Abb. 3.13).

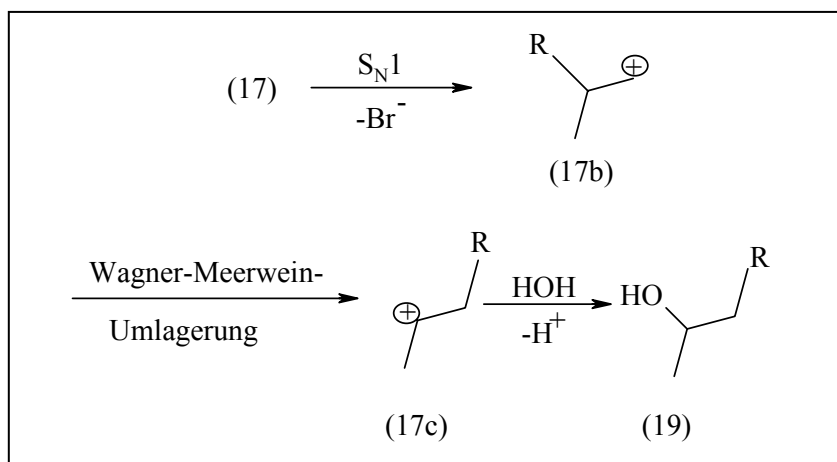


Abb. 3.13: Wagner-Meerwein-Umlagerung des Carbeniumions (17b).

3.6.1.1 Oxidationsversuche von S-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20)

Anschließend wurde versucht, Oxidationsbedingungen für den durch Reduktion von S-Chamazulencarbonsäuremethylester (13) mit Lithiumaluminiumhydrid gewonnenen Alkohol (20)⁶³ herauszufinden. Auch der Aldehyd (21), der durch Reduktion von (13) mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL)⁶⁴ entsteht, könnte als Ausgangsverbindung für Chamazulencarbonsäure (2) dienen (s. Abb. 3.14).

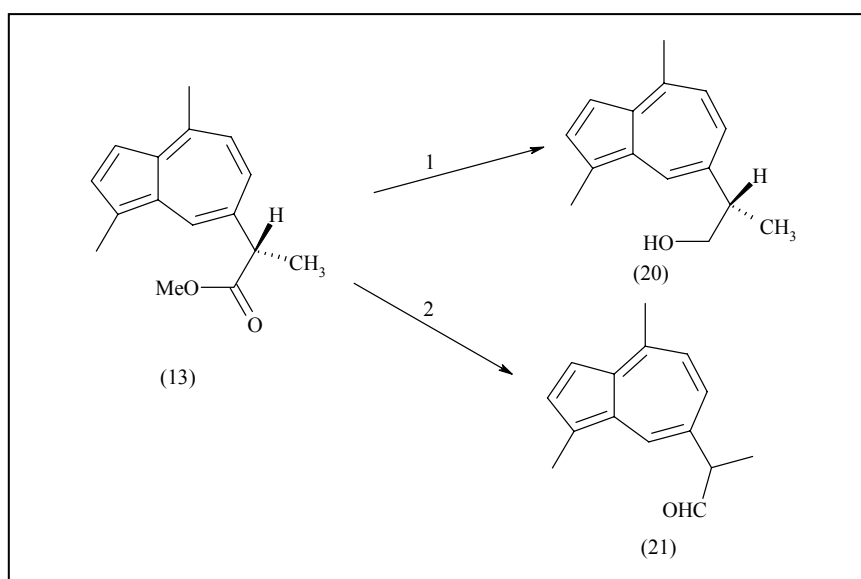


Abb. 3.14: Reduktion von 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäuremethylester (13) 1. zu 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20), 2. zu 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionaldehyd (21).

Die Oxidation wurde mit Reagenzien vorgenommen, die über Esterbildung selektiv den primären Alkohol oxidieren. Das sollte wegen der Säure- und Hitzeempfindlichkeit von Chamazulencarbonsäure möglichst im neutralen Milieu oder mit neutral reagierenden Oxidationsmitteln und auch ohne Erhitzen stattfinden. Die zur Oxidation von (20) und (21) verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3.3 aufgelistet; siehe dazu auch Abb. 3.16.

Verbindung	Reagenzien/Bedingungen	Produkt
(20)	PDC/DMF (unterschiedliche Verhältnisse)	(20) 0% + komplexe labile Produkte
	Jones-Reagenz (1:3.3)	(20) 0% + schwarzgrüne Komplexe
	Jones-Reagenz (1:2)	(20) 0% + schwarzgrüne Komplexe
	Jones-Reagenz (1:1.1)	(20) 20% + schwarzgrüne Komplexe
	PCC/CH ₂ Cl ₂ (1:1.3)	(20) 3% + grüne, polare Polymere.
	PDC/CH ₂ Cl ₂ (1:1.3)	(20) 3% + grüne, polare Polymere.
	KMnO ₄ /Kronenether/Benzol (1:1.2), 6h, RT	(20) > 90 % + (21) + (25)
	KMnO ₄ /CH ₂ Cl ₂ /TDA-1 (1:3), 6h, RT	(20) ca. 25% + 35% (26) + (25)
	KMnO ₄ /Aceton (1: 1.8)	(20) ca. 10% + grüne, polare Polymere.
	BaMnO ₄ /CH ₂ Cl ₂ (1:1.5), 12h, RT	(20) ca. 25% + (25) 2%.
(21)	Oxalylchlorid, DMSO, TEA (Swern-Oxidation)	(21) 0%
	KMnO ₄ /Aceton (1: 1.8)	(2) 0 % + (21) < 5%
	NaClO ₂ /Acetonitril	(2) 0 % + (21) < 1%

Tab. 3.3: Die verwendeten Reagenzien zur versuchten Oxidation von (20) und (21).

3.6.1.2 Oxidation von 2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22)

Um herauszufinden, welche Oxidationsmittel für den gewünschten Zweck geeignet sind, wurden Vorversuche mit einem Profen-Alkohol unternommen.

Bei der Oxidation des „Ibuprofen-Alkohols“ 2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22) mit 3 Äquivalenten Pyridiniumdichromat (PDC) in Dimethylformamid (DMF)⁶⁵ wurde das Acetophenon (23) mit bis zu 50% Ausbeute erhalten. Neben der Säure „Ibuprofen“ (24), die in ca. 45% Ausbeute erhalten wurde, gab es auch andere Nebenprodukte (Abb. 3.15).

Ein ähnliches Verhalten konnten wir bei der Oxidation von (22) mit Jones-Reagenz feststellen.⁶⁶

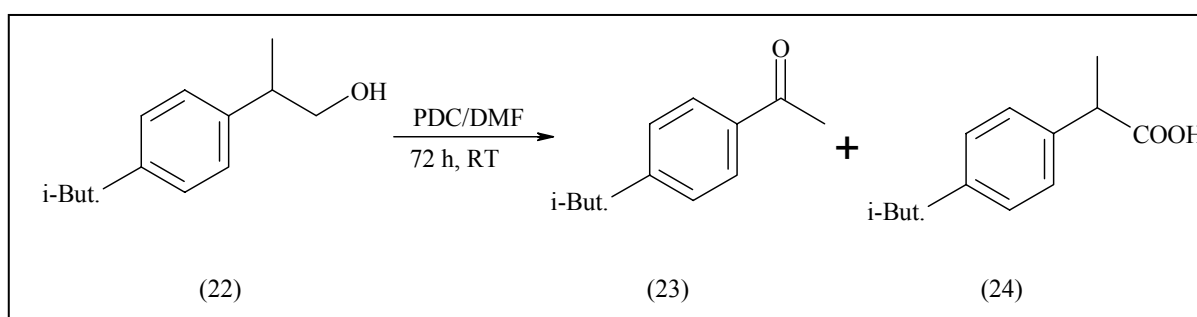


Abb. 3.15: Oxidation von 2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22) mit PDC.

Zudem wurde von uns die Frage untersucht, ob die Säure Ibuprofen (24) mit Jones-Reagenz zum Keton (23) reagiert.⁶⁷ In der Tat wird die Säure (24) mit Jones-Reagenz bis zu 20% Ausbeute zum Acetophenon (23) oxidiert.

Die von mir versuchte Oxidation von (20) mit PDC in DMF unter verschiedenen Reaktionsbedingungen und mit variabler Oxidationsdauer führte weder zum gewünschten Produkt, der Chamazulencarbonsäure (2), noch zum entsprechenden Methylketon-Derivat. Es entstehen mehrere Produkte, die zum Teil labil sind. Mit Jones-Reagenz war der unversehrte Alkohol (20) neben vielen Nebenprodukten nachweisbar.⁶⁷ (s. Tab. 3.3)

Das Oxidationsmittel erwies sich somit als unspezifisch, obwohl das PDC-Reagenz den Vorteil hat, dass es im Gegensatz zur PCC und Jones-Reagenz neutrale Eigenschaften hat.⁶⁸

3.6.1.3 Oxidation mit Kaliumpermanganat

Die Oxidation des primären Alkohols (20) mit Kaliumpermanganat in Benzol verlief nicht im gewünschten Sinne. In Gegenwart von Kronenether (Dicyclohexyl-18-krone-6)⁶⁹ erfolgt Oxidation der primären Alkoholfunktion zum entsprechenden Aldehyd (21), daneben lässt sich auch der Aldehyd (25) isolieren; hier ist die Methylfunktion an C-1 des Fünfrings oxidiert.

Beide Oxidationsprodukte gewinnt man in unbefriedigender Ausbeute, ca. 1%. Ein großer Anteil des Edukts kann zurückgewonnen werden. Durch die Oxidation von (20) mit Kaliumpermanganat in Dichlormethan in Gegenwart von Tris-[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]amin (TDA-1) entstand das Methylketon-Derivat (26) zu 35% als Hauptprodukt. Daneben war auch (25) nachzuweisen.

Die Oxidation des sekundären Alkohols (19) sowie des primären Alkohols (20) mit Bariummanganat in Dichlormethan⁷⁰ als Solvens führt zu den Aldehyden (27) und (25). Wiederum ist die Methylgruppe an C-1 im Fünfring Ziel des oxidativen Angriffs, die sterisch behinderte sekundäre Alkoholfunktion der Seitenkette von (19) bleibt unversehrt (Abb. 3.16).

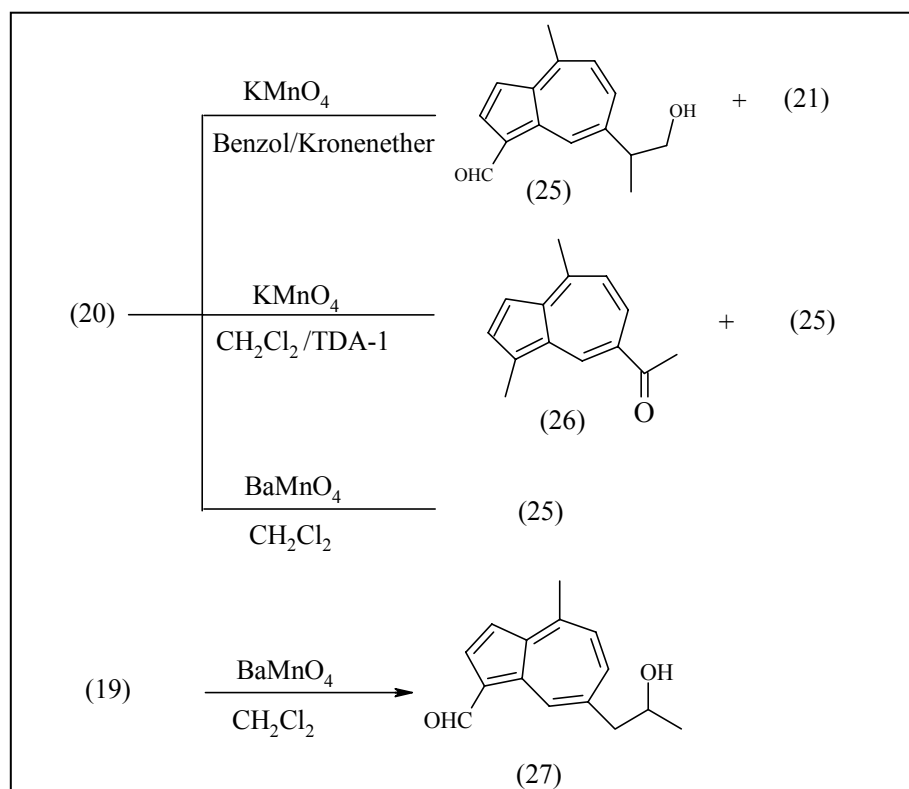


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Oxidation von (20) und (19).

3.6.2 Synthese von Chamaviolin (28)

Chamaviolin, 7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd (28), wurde von uns erfolgreich, wenn auch in kleiner Ausbeute, aus Chamazulen (3) durch Oxidation synthetisiert.

1983 hatten Motl et al. Chamaviolin (28) aus frischen Kamillenblüten gewonnenes ätherisches Öl isoliert und identifiziert.⁷¹ Azulenaldehyd-Synthesen, ausgehend von entsprechenden Azulenen, gelangen Treibs (1957)⁷² und Kohara (1969)⁷³ in sehr geringen Ausbeuten.

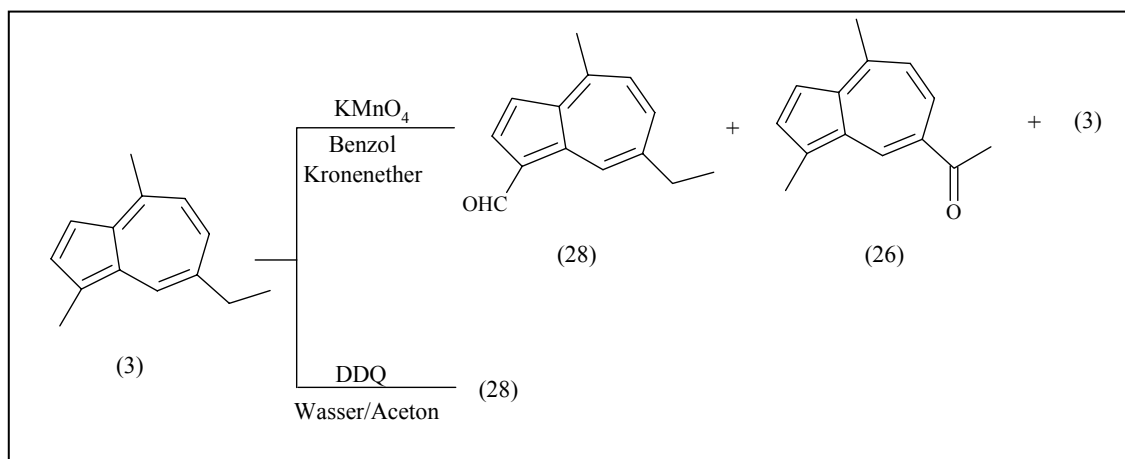


Abb. 3.17: Oxidation von Chamazulen (3) zu Chamaviolin bzw. 7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd (28).

Die Oxidation von Chamazulen (3) zu Chamaviolin (28) wurde in zwei Milieus durchgeführt, zum einen mit Kaliumpermanganat in Benzol im Gegenwart von Kronenether⁶⁹ und zum anderen mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (DDQ) in Wasser/Aceton (1:9).⁷⁴ Die erste Methode hat den Vorteil, dass neben der spezifischen Oxidation der Methylgruppe an C-1 des Fünfrings und der Entstehung des Methylketon-Derivates (26) in kleiner Menge das Edukt (3) zu ca. 95% zurückgewonnen wird.

Im Gegensatz dazu sind im polaren Milieu (Wasser/Aceton) neben (28) viele Beiprodukte - darunter auch grüne Polymere, detektiert per DC - unter Verbrauch an Chamazulen (3) entstanden. In beiden Systemen war die Ausbeute an Chamaviolin (28) nur ca. 1%. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bis 24 Stunden konnte die Ausbeute an (28) nicht verbessern. Das ist trotzdem nicht schlecht, weil die Substanz bisher synthetisch oder durch Isolierung für weitere Untersuchungen praktisch nicht zur Verfügung stand.

3.6.3 Synthese von 7-Isopropyl-1-methyl-4-azulenessigsäure (29)

7-Isopropyl-1-methyl-4-azulenessigsäure (29) wurde aus 7-Isopropyl-1,4-dimethylazulen (16) synthetisiert.⁷⁵ Die Umsetzung von (16) mit Diisopropylamin und Butyllithium in absolutem Diethylether bei -20 °C unter einem Argonstrom führt nach anschließender Einleitung von getrockneten CO₂ zu (29). Nach Umkristallisation aus n-Hexan wurden blaue nadelförmige Kristalle erhalten. (s. Abb. 3.18)

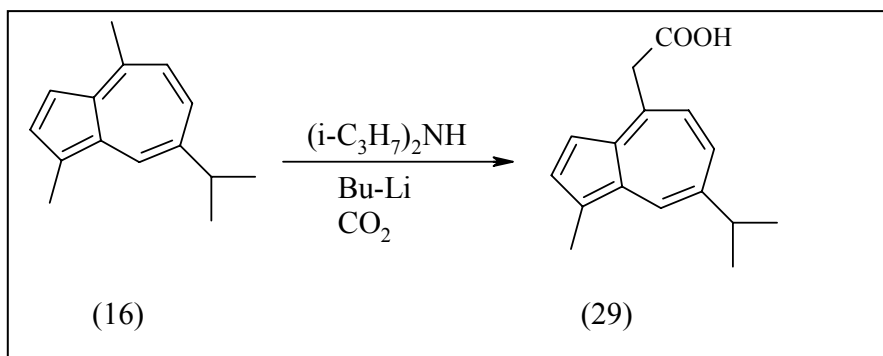


Abb. 3.18: Synthese von 7-Isopropyl-1-methyl-4-azulenessigsäure (29)

Kapitel 4

Pharmakokinetische und pharmakologische Charakterisierung

4.1 Literaturüberblick

Die antiphlogistische Wirkung von Matricin und seinem Abbauprodukt Chamazulen wird seit langer Zeit in zahlreichen Studien mit tierexperimentellen Modellen sowie an isolierten Organen und in Enzymtests untersucht.^{3,6-9}

Die antiphlogistische Wirkung beruht auf einer Enzymhemmung und auf antioxidativen Effekten innerhalb der Arachidonsäurekaskade, aus welcher wichtige Mediatoren für Entzündungsprozesse hervorgehen. Bei in-vitro-Untersuchungen weist Matricin keinerlei hemmende Wirkung auf die Bildung der 5-Lipoxygenase- und der Cyclooxygenase-Metabolite auf. Die Peroxidation wurde von Matricin nur schwach unterdrückt (s. Kap.1).⁶ Daraus ging hervor, dass Matricin nur die Vorstufe antiphlogistischer Stoffe ist; man vermutete damals, dass Chamazulen einer dieser Stoffe sei.

Die Ergebnisse von in-vivo-Untersuchungen widersprachen dieser Deutung, da Matricin eine stärkere Aktivität als Chamazulen zeigte, was sich durch eine langsame Umwandlung von Matricin in Chamazulen nicht erklären lässt (s. Kap. 1).^{8,9}

Da Matricin selbst in vitro unwirksam ist, deutet sich hier an, dass es nicht nur zu Chamazulen, sondern auch in eine wirksamere Substanz umgewandelt wird.

Neuwald beschäftigte sich schon 1948 mit der entzündungshemmenden Wirkung des Proazulens. Er stellte fest, dass Kamillenextrakt erst nach Erhitzen wirksam war, und schloss auf die Unwirksamkeit des Proazulens.^{76,77}

Zu dieser Schlussfolgerung sind auch Reinicke, Barton⁷⁸ und Jung⁷⁹ gekommen. Allerdings wurde festgestellt, dass das verwendete pharmakologische Modell, nämlich Senfölschemosis am Kaninchenauge, ungeeignet war.⁸⁰

1952 stellte Stahl fest, dass für die Wirkung proazulenhaltiger Kamillen- und Schafgarbenauszüge bei peroraler Applikation Azulene verantwortlich sind, da im sauren Milieu des Magensaftes die Proazulene in kurzer Zeit in Azulen und unter Umständen in grüne Farbstoffe übergeführt werden.⁸¹

Auch G. Kunert⁸² hatte beobachtet, dass frischer Kamillentee nach einer Verweildauer von 20-30 Minuten im Magen eine deutlich grünblaue Färbung annahm.

Die Zersetzung des Matricins im sauren Milieu oder beim Erhitzen, über die Chamazulencarbonsäure zum blauen Chamazulen, wird in der Literatur mehrfach beschrieben.⁸¹⁻⁸⁵

Ghassemi (1988)³¹ untersuchte die Pharmakokinetik von ¹⁴C-Matricin nach oraler Gabe. Drei Stunden nach Verabreichung des ¹⁴C-Matricins an weiße Mäuse wurde die Verteilung der ¹⁴C-Radioaktivität in Organ- und Urinextrakten bestimmt; anschließend wurden die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und nach Anfertigung von Autoradiogrammen ausgewertet. Die Ergebnisse seiner Versuche zeigten, dass nur eine geringe Konzentration von intaktem Matricin im Verdauungstrakt, im Blut und im Urin vorkam. Nach den Metabolismusstudien konnte festgestellt werden, dass die Matricinmetabolite immer in höheren Konzentrationen in den Organen auftraten als Matricin. Zu den Metaboliten gehören das Chamazulen und andere apolare Abbauprodukte, deren antiphlogistische Wirkung nicht bekannt ist.

Nach ihrer Isolierung durch Stahl (1954)¹⁰ erweckte die Chamazulencarbonsäure, ein tief blaues Öl mit charakteristischem Geruch, nicht das Interesse der Forscher.

Erst 2001 hat Goeters in unserer Arbeitsgruppe ausgehend von der Ähnlichkeit mit 2-Arylpropionsäuren Chamazulencarbonsäure erneut isoliert, chemisch und stereochemisch charakterisiert und erstmals ihre antiphlogistische Wirkung untersucht.¹¹

Sie hemmt COX-2, aber nicht COX-1 und hat wie die Profen-Eutomere S-Konfiguration. Die physikochemischen Parameter wie der log D und pK_a – numerisch dem Ibuprofen fast gleich – lassen auf gute Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe schließen, trotz ihrer im sauren Milieu geringen Stabilität.

Die antiphlogistische Aktivität von Chamazulencarbonsäure wurde durch Standard-Tiermodelle nach lokaler als auch oraler Applikation ermittelt (s. Kap. 1).¹¹

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob nach oraler Gabe von Matricin Chamazulencarbonsäure der antiphlogistisch wirksame Stoff ist, oder ob diese lange umstrittene aktive Substanz das Proazulen oder eines seiner Zersetzungsprodukte ist.

Die pharmakokinetischen Untersuchungen von Matricin wurden von uns zunächst in vitro durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurde eine HPLC-Methode zur Chamazulencarbonsäure-Bestimmung aus humanen Blutproben entwickelt und validiert. Anschließend wurden in-vivo-Versuche von Matricin (1) und dem Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure (30) an freiwilligen Probanden durchgeführt.

4.2 In-vitro-Untersuchungen des Matricins

Matricin ist unter den sauren Bedingungen des Magensaftes instabil; stabiler ist es im alkalischen Milieu.^{31,32} Chamazulencarbonsäure verhält sich analog.¹¹ Nach oraler Gabe würde Matricin zunächst im Magen aufgefangen, mit einer Verweildauer von ca. 30 Minuten.

4.2.1 Behandlung mit künstlichem Magensaft

Matricin wurde mit künstlichem Magensaft, hergestellt nach einer Vorschrift der United States Pharmacopiea (USP)⁸⁶ 30 Minuten lang bei 37 ± 1 °C behandelt. Die milchige blaue Lösung wurde extrahiert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Die detektierten Hauptzersetzungsprodukte konnten durch R_F -Wert-Vergleiche nach Einsprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz oder durch Eigenfarbe der Metabolite identifiziert werden. Mit DC-Scanner erfolgten weitergehende qualitative Nachweise und die quantitative Auswertung.

Nach der Behandlung mit dem künstlichen Magensaft war Matricin nicht mehr nachweisbar und zu 50% in Chamazulencarbonsäure (2) umgewandelt. Zu erkennen waren andere Zersetzungsprodukte, die polarer sind als (2), sowie die am Startpunkt gebliebenen grünen Polymere. Auch andere lipophile Farbstoffe - wahrscheinlich Azulene - waren nachweisbar, aber kein Chamazulen.

4.2.2 Behandlung mit künstlichem Dünndarmsaft

Matricin wurde mit künstlichem Dünndarmsaft, hergestellt nach Vorschrift der United States Pharmacopiea (USP)⁸⁶ eine Stunde lang bei 37 ± 1 °C behandelt. Die Untersuchung des Extrakts nach chromatographischer Trennung unter der UV-Lampe zeigte einen Hauptfleck, der bei Aufnahme der Remissionsortskurve als Matricin identifiziert wurde. Die quantitative Bestimmung nach in Kap. 2.2.1 beschriebener Methode zeigte das unveränderte Vorliegen von Matricin mit praktischer keiner Um- oder Zersetzung.

Abbildung 4.1 Detektion mit DC-Scanner des Hauptflecks der Matricinbehandlung: A. mit künstlichem Magensaft und B. mit künstlichem Dünndarmsaft.

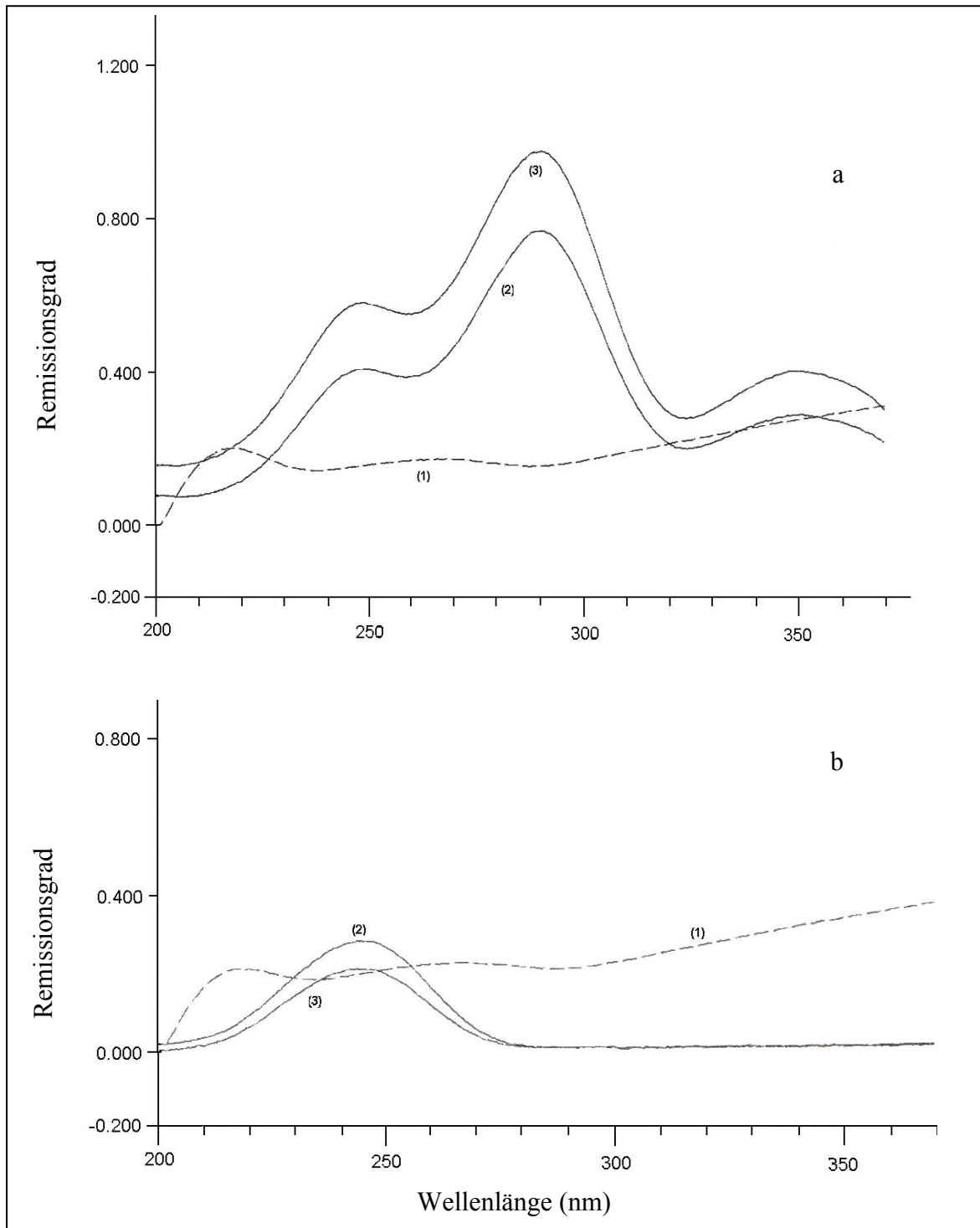


Abb. 4.1: Simulierte pharmakokinetische Untersuchung des Matricins
a. Künstlicher Magensaft, Remissionsortskurven 1. Kieselgel 2. Chamazulen-carbonsäure Standard 3. Hauptfleck Spektrum.
b. Künstlicher Dünndarmsaft, Remissionsortskurven. 1. Kieselgel 2. Matricin Standard 3. Hauptfleck Spektrum.

4.3 HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Chamazulencarbonsäure (2) im Serum

Aufgrund der Ergebnisse dieser in-vitro-Versuche stellt Matricin (1) eine Vorstufe der Chamazulencarbonsäure (2) dar, die sich wegen bestimmter physikochemischer Eigenschaften¹¹ und gemäß der bekannten Regeln von Lipinski et al.⁸⁷ durch gute Bioverfügbarkeit auszeichnen dürfte. Zur Vorbereitung der pharmakokinetischen Untersuchungen in vivo am Menschen wurde eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Chamazulencarbonsäure (2) im Serum entwickelt.

Chamazulencarbonsäure ist strukturell den chiralen, synthetischen, antiphlogistisch wirksamen Arzneistoffen (NSAIDs) ähnlich. Zusammenfassungen zur HPLC-Analytik von nichtsteroidalen antiphlogistischen Stoffen (NSAIDs) wurden in der Literatur mehrfach publiziert.^{88,89}

Für die HPLC-Analytik wurde C₈ oder C₁₈ Reverse Phase als stationäre Phase und das Fließmittelgemisch Acetonitril/Wasser beschrieben.⁹⁰

4.3.1 Entwicklung der Methode

Ibuprofen ist ein chemisch stabiler Arzneistoff, welcher der Chamazulencarbonsäure in Struktur, pK_a und log D ähnelt.¹¹

Zur HPLC-Bestimmung diente uns Ibuprofen als interner Standard. Die Elution beider Substanzen – Ibuprofen und Chamazulencarbonsäure – erfolgte mit dem Fließmittelgemisch [Acetonitril/Wasser (pH 3) 4:6] in einem isokratischen Lauf von 10 Minuten auf einer RP-18 Säule. Die Retentionszeiten für Chamazulencarbonsäure und Ibuprofen betrugen 6.9 und 8.7 Minuten. Die Detektion erfolgte bei zwei Wellenlängen, 221 und 286 nm, Absorptionsmaxima (λ_{max}) von Ibuprofen und Chamazulencarbonsäure (2).

Ein Chromatogramm und die dazugehörigen Spektren zeigt Abbildung 4.2.

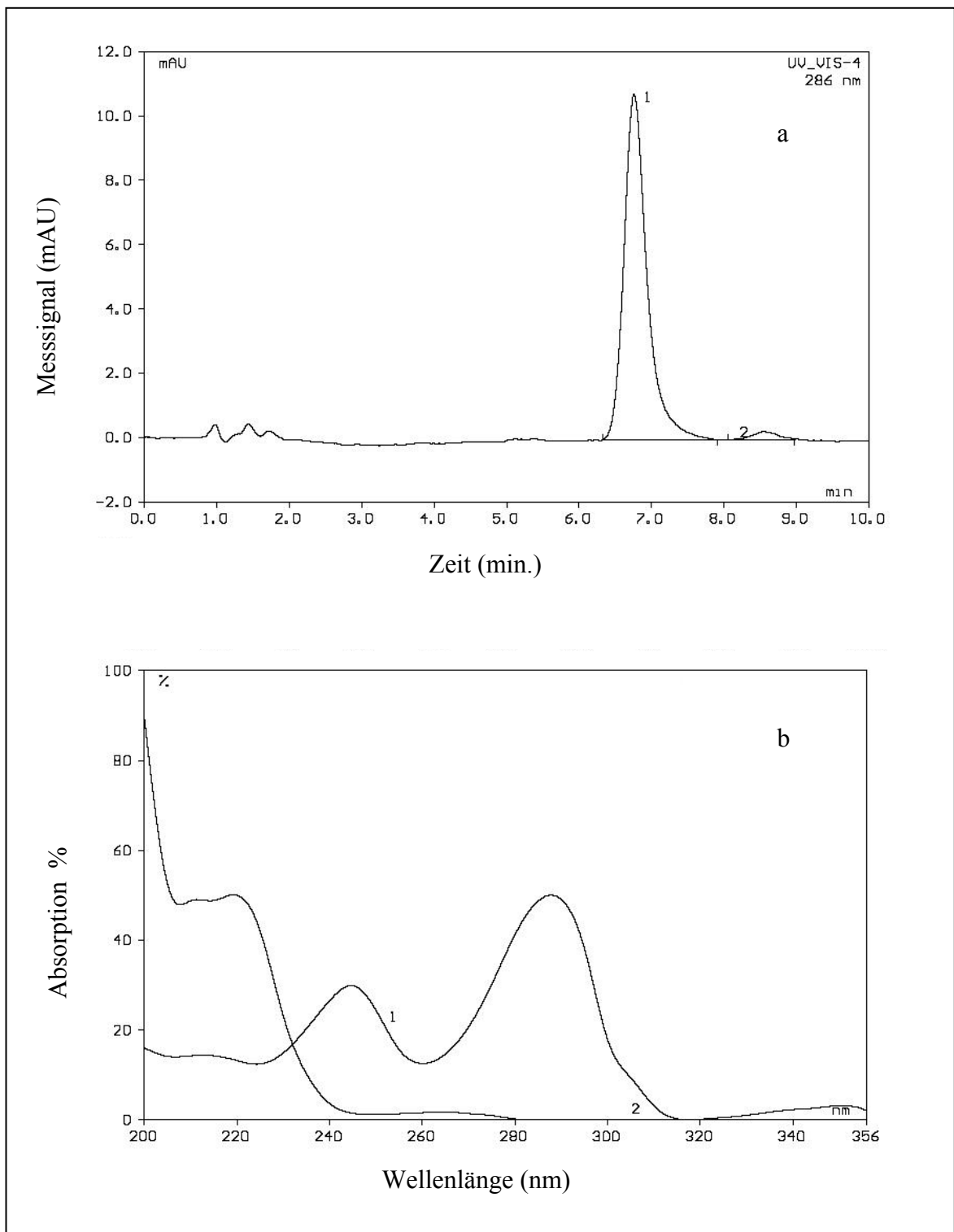


Abb. 4.2a: HPLC-Chromatogramm (Detektion bei 286 nm) von Chamazulencarbonsäure (1) und Ibuprofen (2) extrahiert aus Serum.

Abb. 4.2b: UV-Spektren von Chamazulencarbonsäure und Ibuprofen gelöst im HPLC-Fließmittelgemisch.

4.3.2 Validierung der HPLC-Methode

Um eine adäquate Durchführung der quantitativen Bestimmung zu gewährleisten, ist eine Validierung der verwendeten Methoden unerlässlich. Als Grundlage für die Methodik der Validierung boten sich die Leitlinien „Analytical validation and validation of analytical procedures. Definition and terminology“ (2000) der ICH an.

Art und Umfang der Validierungsschritte sind jeweils abhängig vom analytischen Problem. Im Fall HPLC-analytischer Methoden für Pharmakokinetik-Studien erfolgt die Validierung in Anlehnung an die Empfehlungen von Shah et al. (1992)⁹¹, Bressolle et al. (1996)⁹² und Causen (1997)⁹³, die in vielen Literaturbeiträgen zur Beurteilung der statistischen Daten zitiert werden.

Zur Validierung gehören folgende Parameter: Linearität, Präzision, Richtigkeit, Wiederfindungsrate, die Bestimmungsgrenze, Selektivität und Empfindlichkeit.

4.3.2.1 Linearität

Die Überprüfung auf Linearität gibt Aufschluss darüber, in welchem Konzentrationsbereich der geprüften Substanz die Menge an Substanz mit der Größe des Messsignals korreliert.

Die Kalibrierkurve wurde über die Ermittlung von Messsignalquotienten aus Chamazulencarbonsäure und dem internen Standard in Bezug auf unterschiedliche Chamazulencarbonsäurekonzentrationen erstellt.

Die beschriebene Methode war linear im Konzentrationsbereich 0.1-30 µg/ml. Die Geradengleichung wurde über 5 Tage auf Präzision überprüft. Die Daten dazu sind in Tabelle 4.1 zu finden.

Die Funktion der Regressionsgerade ist $Y = (0.1198 \pm 0.0024)X - (0.0058 \pm 0.013)$

Bei angenommener t-Verteilung liegt der Mittelwert des Korrelationskoeffizienten in einem Vertrauensbereich von 95% Wahrscheinlichkeit (α Irrtumswahrscheinlichkeit ≤ 0.05) und einem Freiheitsgrad (n-1).

	Steigung	Korrelationskoeffizient R^2
Mittelwert	0.1198	0.9994
Standardabweichung S	0.0024	0.0006
Variationskoeffizient %	2	0.06

Tab. 4.1: Statistische Daten der Linearität, Plasmakalibrierungskurven von Chamazulencarbonsäure. $n = 5$ und Konzentrationsbereich 0.1- 30 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2.2 Präzision und Richtigkeit

Die Präzision ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung der analytischen Methode.

Es wurde auf die Präzision der Methode in der Serie (intra assay precision) und von Tag zu Tag (inter assay precision) untersucht. Die Präzision wurde als Variationskoeffizient präsentiert. Die Methode gilt als präzise, wenn der Variationskoeffizient $< 15\%$ und an der Nachweisgrenze (LOQ) $< 20\%$ beträgt.

Die Richtigkeit der Methode beschreibt den Grad der Übereinstimmung der gemessenen Werte von den wahren Werten. Die Ergebnisse werden als % relative Abweichung von den wahren Werten präsentiert. Die Methode gilt als richtig, wenn die relative Abweichung $< 15\%$ und an der Nachweisgrenze $< 20\%$ ist.⁹¹

Die Daten über die Präzision und die Richtigkeit sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 zu finden.

4.3.2.3 Wiederfindungsrate

Um die Effizienz der Extraktion von Chamazulencarbonsäure aus dem Serum zu überprüfen, wird die Wiederfindungsrate bestimmt. Sie lässt sich aus der folgenden Gleichung berechnen.

$$\% \text{ Wiederfindungsrate} = \frac{\text{Fläche unter der Kurve, extrahierte Probe}}{\text{Fläche unter der Kurve, direkte Injektion}} \cdot 100$$

Im untersuchten Messbereich von 0.1-30 µg/ml lag die Wiederfindungsrate zwischen 93-112%. Der Variationskoeffizient (% VK) lag zwischen 4.7-13%. In Tabelle 4.4 sind die Angaben zur Wiederfindungsrate zusammengestellt.

Konzentration µg/ml	Mittelwert	Präzision	Richtigkeit
		% VK	% relative Abweichung
0.10	0.107	5.6	+7.0
0.50	0.513	15.0	+2.6
1.00	0.930	10.0	-7.0
5.00	5.100	3.5	+2.0
10.0	9.820	3.2	-1.8
20.0	19.390	2.6	-3.5
30.0	27.230	3.5	-9.2

Tab. 4.2: Intra assay Precision und Richtigkeit der Bestimmung von Chamazulen-carbonsäure im Serum. (n = 6)

Konzentration µg/ml	Mittelwert	Präzision	Richtigkeit
		% VK	% relative Abweichung
0.10	0.115	9.00	+1.5
0.50	0.46	10.00	-8.0
1.00	0.90	11.00	-10.0
5.00	4.90	7.20	-2.0
10.0	10.20	5.30	+2.0
20.0	18.50	5.00	-7.5
30.0	28.40	1.95	-5.3

Tab. 4.3: Inter assay Precision und Richtigkeit der Bestimmung von Chamazulen-carbonsäure im Serum. (n = 5)

Konzentration µg/ml	% Wiederfindungsrate	% VK
0.1	112	7.0
0.5	95	9.6
1.0	93	10.0
5.0	102	10.0
10.0	103	4.8
20.0	97	5.0
30.0	95	4.7

Tab. 4.4: Wiederfindungsrate von Chamazulencarbonsäure nach (n = 6) Wiederholungen

4.3.2.4 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die niedrigste Konzentration, die unter den analytischen Bedingungen in dem vorliegenden Material noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0.1 µg/ml, mit einem % VK < 20%, was der Anforderung entspricht.⁹¹

4.3.2.5 Selektivität

Selektivität heißt, dass mit der jeweiligen analytischen Methode die zu bestimmende Substanz präzise und spezifisch aus der Probenmatrix heraus bestimmt werden kann. Das bedeutet, dass das Messsignal eindeutig und ausschließlich auf die zu bestimmende Substanz zurückgeführt werden kann. Identität und Reinheit müssen also nachgewiesen werden. Das gelingt durch Verwendung von Standards und Vergleich der jeweiligen Retentionszeiten und der entsprechenden Spektren.

4.3.2.6 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ergibt sich aus der Änderung der Messwerte bei Änderung der Konzentration der zu bestimmenden Substanz. Als Maß für die Empfindlichkeit gilt die Steigung der Kalibriergeraden.

Die beschriebene Methode erwies sich durch die statistische Bewertung als präzise, richtig, selektiv und empfindlich.

4.4 Extraktionsverfahren

Die Extraktion eines Stoffs aus biologischem Material ist ein sehr wichtiger Schritt vor der Flüssigchromatographie und sehr entscheidend für ihre Effizienz. Das Hauptproblem bei biologischen Flüssigkeiten, besonders Plasma, ist ihr hoher Anteil an Proteinen, was eine direkte Injektion auf die Säule verbietet. Die Proteine können durch Präzipitation, Ultrafiltration, Gleichgewichts-Dialyse und Mikrodialyse abgetrennt werden.⁹⁴ Die Extrakte von Ultrafiltration, Gleichgewicht-Dialyse und Mikrodialyse können nur freie, nicht an Protein gebundene Stoffe erfassen. Andere Verfahren, die sauberere Extrakte liefern können, sind flüssig-flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion; diese sind zeitaufwändig und enthalten mehrere Schritte, die zu Verlusten des relevanten Stoffs führen können.⁹⁵

4.4.1 Flüssig-flüssig Extraktion

Die zu bestimmende Substanz wird aus den biologischen Materialien nach vorausgehender Verdünnung und Einstellung des optimalen pH mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel extrahiert. Die substanzhaltige organische Phase wird unter vermindertem Druck oder mit einem Stickstoffstrom entfernt. Der getrocknete Rückstand wird in einem kleinen Volumen eines geeigneten Lösungsmittels oder im Fließmittel gelöst.

Zuerst wurden optimale Bedingungen zur Extraktion von Chamazulencarbonsäure ermittelt; dabei war zu beachten, dass Chamazulencarbonsäure oxidationsempfindlich, thermolabil und besonders im sauren, wässrigen Milieu instabil ist.

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Optimierung des Extraktionsverfahrens dargestellt.

Die Extraktion wurde im pH-Bereich 2 bis 4 untersucht. Eine deutlich bessere Extraktion von Chamazulencarbonsäure war mit verdünnten Lösungen erreichbar, was auf ihre Instabilität im sauren Milieu zurückzuführen ist. Anorganische Säuren haben den Vorteil, dass sie sich häufig nicht in der organischen Phase lösen und dementsprechend keine zusätzlichen Verunreinigungen bringen.

Eine zusätzliche Behandlung mit Natriumwolframat (Na_2WO_4) im sauren Medium führt zu einer Denaturierung von Proteinen, damit konnte die Ausbeute an Chamazulencarbonsäure verglichen mit dem Zusatz von Säuren um 15% erhöht werden, trotz des Risikos, dass ein Teil der Substanz durch Adsorption an oder Einschluss in die ausgefallenen Proteine verloren geht.

Das Optimum der Extraktion liegt bei pH-4, der beim Ansäuern mit 0.01 M H_3PO_4 erreicht wird (s. Tab. 4.5).

Diisopropylether (DIPE) hat eine geringere Dichte als Wasser, was die Trennung aus der wässrigen Phase im Vergleich zu Chloroform und Dichlormethan erleichtert; er nimmt im Gegenteil zu Diethylether und tert-Butylmethylether kein Wasser auf und ist leicht verdampfbar.

Die Abbildung 4.3 stellt die Vorbereitung der Plasma-Proben dar.

Reagenz	% Wiederfindungsrate	
	CCA	Ibuprofen
Phosphorsäure 0.5 M	61	80
Phosphorsäure 0.1 M	72	82
Phosphorsäure 0.05 M	77	84
Phosphorsäure 0.01 M	92	90
Phosphatpuffer 1.5 M (pH 2)	61	77
Phosphatpuffer 1.0 M (pH 2)	66	78
Phosphatpuffer 0.5 M (pH 2)	79	89
Salzsäure 0.1 M	73	80
Salzsäure 0.05 M	73	76
Salzsäure 0.01 M	85	82
Ameisensäure 1.0 M	70	75
0.3 N Na ₂ WO ₄ /1.0 M Ameisensäure	87	86
Ameisensäure 0.5 M	65	79
0.3 N Na ₂ WO ₄ /0.5 M Ameisensäure	75	83
Ameisensäure 0.05 M	85	83
Ameisensäure/NaOH 1.0 M (pH 2)	70	84
Trifluoressigsäure 0.1 M	23	78
Trifluoressigsäure 0.05 M	55	87
Trifluoressigsäure 0.01 M	80	83
Essigsäure 7.0 M	73	75
Citronensäure 1.0 M	68	81
Citronensäure 0.5 M	71	83
Citronensäure 0.1 M	76	79

Tab. 4.5: Wiederfindungsrate von Chamazulencarbonsäure (CCA) und Ibuprofen aus 100 µl Serum, angesäuert mit 500 µl der jeweiligen Reagenzien und mit DIPE extrahiert.

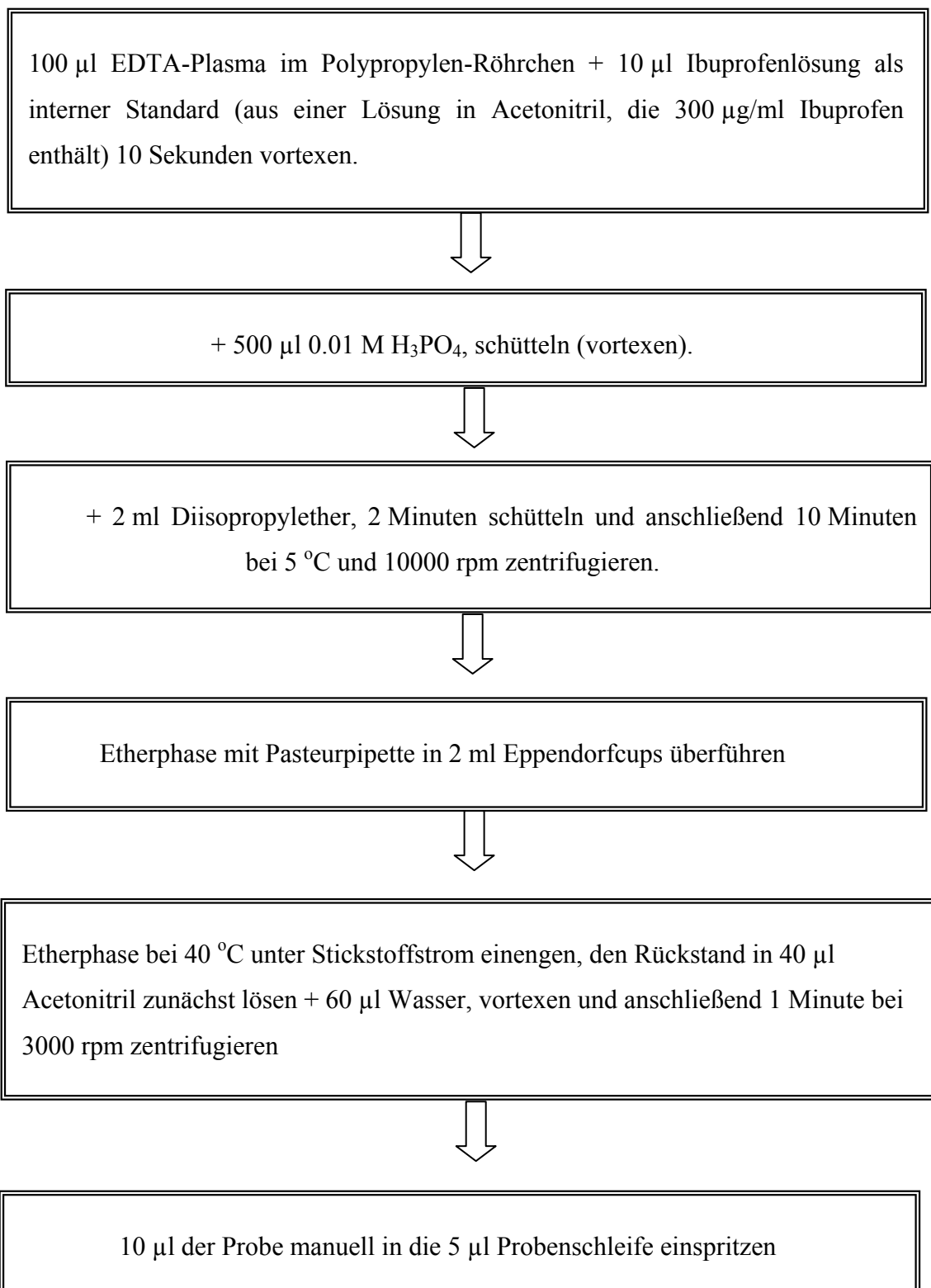


Abb. 4.3: Vorbereitung der Plasma-Proben zum Nachweis von Chamazulencarbonsäure mittels HPLC- Methode.

4.4.2 Festphasenextraktion

In den letzten Jahren hat sich die Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraktion), kurz SPE genannt, als leistungsstarke Probenvorbereitungsmethode etabliert. Ihre Leistungsfähigkeiten zeigt die Festphasenextraktion in einem breiten Anwendungsgebiet, wie z.B. in der pharmazeutischen und biologischen Analytik, in der Lebensmittelanalytik, der organischen Chemie und der Umweltanalytik.

SPE funktioniert nach zwei Prinzipien. Je nach Art der Wechselwirkung werden entweder die Analyten an der Festphase adsorbiert und die Störkomponenten von der Säule gewaschen, oder die gewünschten Analyten laufen direkt durch, während die Störkomponenten adsorbiert werden. Applikationen zur Festphasenextraktion von Arzneimitteln sind auch für Profene beschrieben.⁹⁶⁻⁹⁸

Die Festphasenextraktion der Chamazulencarbonsäure ließ sich mit verschiedenen C₁₈ Festphasen durchführen. Die Wiederfindungsraten von Chamazulencarbonsäure waren kleiner als 50%, die von Ibuprofen lagen zwischen 65-93%; dies lässt sich auf die Oxidationsempfindlichkeit der Substanz auf der großen Oberfläche des Sorbens zurückführen. (s. Tab. 4.6)

Kartuschen	% Wiederfindungsrate	
	Chamazulencarbonsäure	Ibuprofen
Varian Spec C ₁₈	43	93
3M- Empore C ₁₈ SD	22	70
Stratax	5	68
Water Oasis- HLB	5	65
Varian absolut Nexus	16	86
Chrombond easy [®]	10	80

Tab. 4.6: Wiederfindungsrate nach SPE von Chamazulencarbonsäure und Ibuprofen aus Serum.

4.5 In-vivo-Untersuchungen

Unter 4.1 wurde zusammengefasst, was über die Wirkung von Matricin bekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Annahme, dass Chamazulencarbonsäure der wichtigste Matricin-Metabolit ist, zum ersten Mal am Menschen untersucht.

Nach der Zustimmung der Ethikkommission des Klinikums der Philipps-Universität Marburg konnte eine kleine pharmakokinetische Pilotstudie zur Verstoffwechselung von Matricin und Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester durchgeführt werden.

Von drei Probanden wurden je 500 mg Matricin sowie 300 mg Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester von einem Probanden oral eingenommen.

Die Bioverfügbarkeit von Chamazulencarbonsäure nach der Gabe beider Substanzen wurde untersucht.

Gleichzeitig wurden die Prostanoiden im Blut und Urin bestimmt, um einen eventuellen Einfluss auf die Arachidonsäure-Kaskade festzustellen. Dies wurde im Eicosanoidlabor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Marburg nach der in der Arbeitsgruppe von Prof. Seyberth entwickelten GC-MS/MS-Methode bestimmt.

4.5.1 Orale Gabe von Matricin

Durch unsere in-vitro-Versuche hatten wir gezeigt, dass Matricin im künstlichen Magensaft nach kurzer Zeit zu Chamazulencarbonsäure hydrolysiert wird. Um die Bioverfügbarkeit und die pharmakokinetischen Parameter der Chamazulencarbonsäure zu bestimmen, wurden von gesunden, freiwilligen Probanden im Alter 25 bis 30 Jahren, die mind. eine Woche lang keine Medikamente zu sich genommen hatten, 500 mg Matricin oral als wässrige Suspension auf nüchternen Magen genommen. Die Dosis an Matricin berechnet sich aus Experimenten zur Umsetzung von Matricin in Chamazulencarbonsäure im künstlichen Magensaft, die zu einer Dosis an Chamazulencarbonsäure führt, die molar 200 mg Ibuprofen äquivalent ist.

Die Blutproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und der Gehalt an Chamazulencarbonsäure mit der etablierten Methode bestimmt.

11-Dehydro-thromboxan B₂ und 13,14-Dihydro-15-keto-PGE₂ aus Na-Citrat/Indomethacin-Plasma als Biomarker für eine mögliche COX-Inhibierung durch Chamazulencarbonsäure wurden mittels kombinierter Gaschromatographie/Massenspektrometrie bestimmt.⁹⁹

PGE₂, PGE-M und 11-Dehydro-thromboxan B₂ wurden aus je drei 24-h-Sammelurinen 1 Tag vor Gabe, am Versuchstag und 1 Tag nach Gabe mittels GC-MS/MS bestimmt.¹⁰⁰

4.5.1.1 Matricin: eine in-vivo-Vorstufe der Chamazulencarbonsäure

Nach oraler Verabreichung von Matricin war die gezielt gesuchte Chamazulencarbonsäure tatsächlich im Blut nachweisbar und konnte mit der zuvor etablierten Methode quantitativ bestimmt werden.

Die Plasmaspiegelkurven von Chamazulencarbonsäure nach oraler Einnahme von Matricin für drei Probanden stellt Abbildung 4.4 dar.

15 Minuten nach der Einnahme war Chamazulencarbonsäure bei allen Probanden messbar.

75-90 Minuten nach der Einnahme wurde das Konzentrationsmaximum C_{\max} von 1.3-2.2 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Die nachfolgende Abnahme der Chamazulencarbonsäure-Konzentration war bei den Probanden langsam. Gründe dafür könnten eine hohe Proteinbindung, Einlagerung im Fettgewebe und langsame Elimination sein. Es könnte aber auch sein, dass Chamazulencarbonsäure einem enterohepatischen Zyklus unterliegt. Die pharmakokinetischen Parameter wurden berechnet. Sie zeigen - verglichen mit Ibuprofen¹⁰¹ - eine längere Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und ein ähnlich hohes Verteilungsvolumen (V_d). Die Halbwertszeit von Ibuprofen ist 2 Stunden und von Chamazulencarbonsäure 4 Stunden, was auf eine langsamere Elimination hinweist. Das Verteilungsvolumen beträgt 1.4 L/Kg bzw. 1.8 L/Kg, was durch die Lipophilie der Moleküle erklärbar ist. Denn die mittels ACD-Software (Advanced Chemistry Development) berechneten log D von Ibuprofen und Chamazulencarbonsäure bei pH 7.0 sind ähnlich und betragen 1.15 und 0.89. Dies kann auch die lange Verweildauer der Chamazulencarbonsäure im Körper zum Teil begründen (s. 4.5.1.2); vielleicht wird sie auch weniger leicht als Ibuprofen in Glycerolester überführt.

Die physiologischen Schwankungen zwischen den Probanden mit interindividuellen Unterschieden sind deutlich. Die niedrige und flache Kurve ist wahrscheinlich auf die kurz nach Matricin-Einnahme aufgetretene Übelkeit der Probandin zurückzuführen, die zu einer längeren Verweildauer im Magen führen kann, und damit zur Verminderung der Bioverfügbarkeit der Chamazulencarbonsäure, welche im Magensaft instabil ist.

Abbildung 4.5 zeigt die Chromatogramme der Blutproben, die keine Störpeaks bei den erwarteten Retentionszeiten von Chamazulencarbonsäure und Ibuprofen aufweisen.

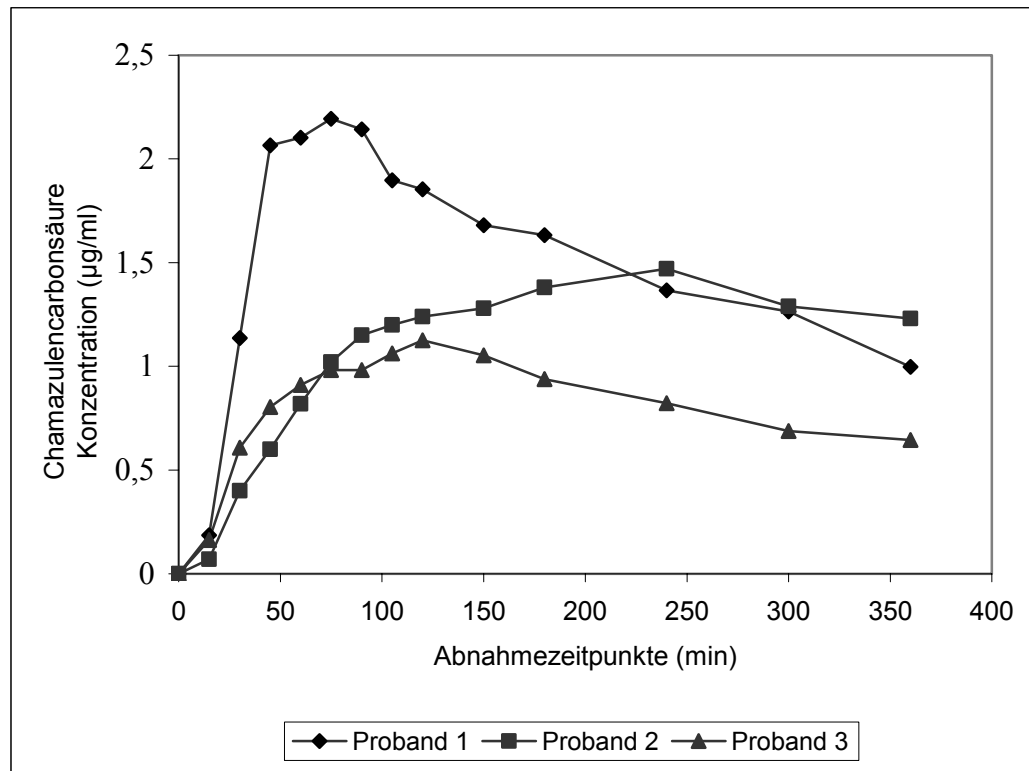


Abb. 4.4: Chamazulencarbonsäureplasmaspiegel nach oraler Gabe von 500 mg Matricin an drei Probanden und Blutentnahme über einen Zeitraum von 6 Stunden.

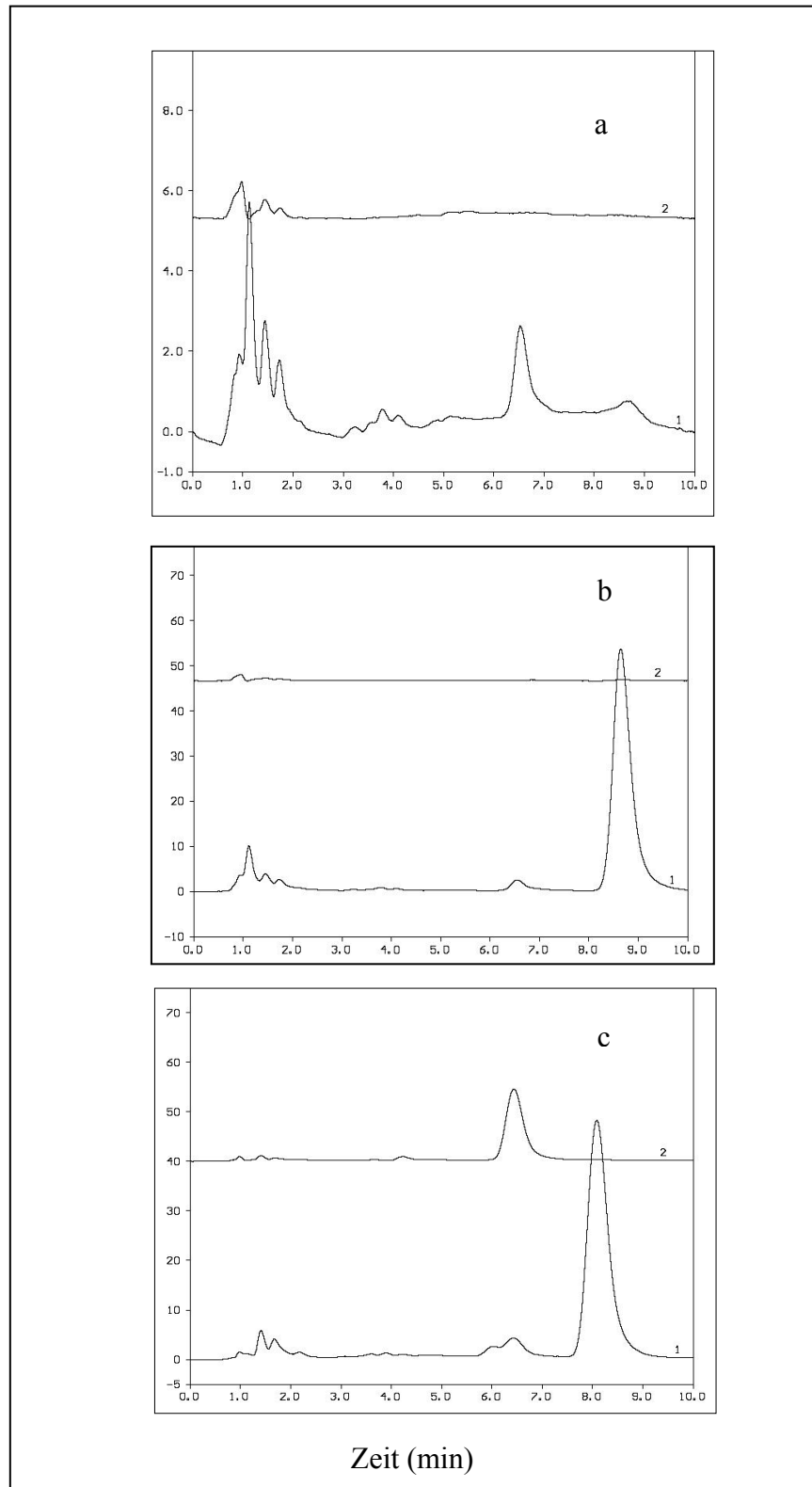


Abb. 4.5: Chromatogramme des in-vivo-Matricinversuchs. 1. Detektion von Ibuprofen bei 221 nm und 2. Detektion von Chamazulencarbonsäure bei 286 nm.
a: Blindprobe. b: Plasma gemischt mit Ibuprofen. c: Plasmaprobe 60 Minuten nach Matricin Gabe.

4.5.1.2 Pharmakokinetische Parameter von Chamazulencarbonsäure

Die Pharmakokinetik beschäftigt sich als Teilgebiet der Pharmakologie mit den Konzentrationsprofilen, die nach Gabe einer Substanz im Körper zu erwarten sind. Die Konzentration eines Stoffs im Körper ändert sich nach seiner Applikation als Funktion der Zeit und wird von folgenden Faktoren beeinflusst:

Freisetzung des Stoffs aus der Arzneiform (Liberation), Absorption (Resorption), Verteilung im Organismus (Distribution), Metabolisierung (Biotransformation) und Elimination.^{102,103}

Um den zeitlichen Verlauf der Konzentration einer Substanz im Plasma zu untersuchen, wurden Modelle entwickelt, die die komplexen Verteilungs- und Eliminationsvorgänge im Körper mathematisch beschreiben.¹⁰⁴

Die halblogarithmische Darstellung von Plasmaspiegelwerten lässt das Verhalten der Chamazulencarbonsäure mit einem Zwei-Kompartiment-Modell nach extravasaler Applikation beschreiben. In diesem Modell wird angenommen, dass sich die Substanz nach Applikation zunächst in einem zentralen Kompartiment verteilt, womit in der Regel das Plasma und gut durchblutete Organe gemeint sind. Aus diesem zentralen Kompartiment wird die Substanz in schlechter durchblutete Gewebe transferiert, das sogenannte periphere Kompartiment.

In diesem Fall lautet die phänomenologische Funktion für die Beschreibung der Plasmaspiegelkurve

$$C_p(t) = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + b \cdot e^{-\beta \cdot t} - C_p(0) \cdot e^{-K_a \cdot t}$$

$C_p(t)$: Konzentration zum Zeitpunkt t .

K_a : Absorptionskonstante.

α : Steigung der Linie A, Hybridkonstante des Verteilungsprozesses.

β : Steigung der Linie B, Hybridkonstante des Eliminationsprozesses, entspricht die Eliminationskonstante K_e .

a : Y-Abschnitt der Linie A.

b : Y-Abschnitt der Linie B

Die Bestimmung der Konstanten erfolgt nach dem Abschälverfahren. Andere Parameter werden mittels bekannter Gleichungen berechnet.¹⁰⁴ Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengestellt.

Chamazulencarbonsäure wird nach der Bildung im Magen schnell absorbiert und erreicht die maximale Konzentration in 1½ Stunden. Das Verteilungsvolumen ist ungefähr genau so groß wie dasjenige von Ibuprofen.

Die Elimination der Säure ist langsam, wie der flache Abfall der Plasmaspiegelkurve zeigt.

Parameter		Wert
C_{\max}	Plasmaspiegelmaximum	1.3 -2.2 µg/ml
t_{\max}	Zeitpunkt des Plasmaspiegelmaximums	1.25-1.5 h
K_a	Absorptionskonstante	0.53 h ⁻¹
α	Hybridkonstante des Verteilungsprozesses	0.37 h ⁻¹
β	entspricht Eliminationskonstante	0.17 h ⁻¹
a	Y-Abschnitt der Linie A	0.69 µg/ml
b	Y-Abschnitt der Linie B	0.84 µg/ml
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	4.0 h
D	berechnete Dosis ausgehend von in-vitro-Vorversuch	200 mg (2)
V_d	Verteilungsvolumen, f (Diffusionskoeffizient) = 1	133 L
(AUC) _{0-∞} Fläche unter der Konzentration- Zeit Kurve		14.7 µg*h/ml

Tab. 4.7: Pharmakokinetische Parameter der Chamazulencarbonsäure (2).

4.5.2 Orale Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester (30)

Der Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure ist ein Prodrug, das eine hohe antiphlogistische Wirkung aufwies.¹¹

300 mg Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure (30) wurde verkapselt mit Wasser auf nüchternen Magen eingenommen. Die Blutabnahme erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, um Chamazulencarbonsäure (2) zu bestimmen. Die Plasmaspiegelkurve von Chamazulencarbonsäure nach der Einnahme von (30) zeigt die Abbildung 4.6.

Nach 1 Stunde war Chamazulencarbonsäure (2) im Blut nachweisbar und wurde mittels der oben etablierten Methode quantitativ bestimmt. Oxymethylpivaloyl ester sind Einschleuß-Ester, die während der Resorption im Dünndarmepithel gespalten werden, was den Wirkstoff freisetzt.^{105,106}

Nach der Magenpassage wird (30) schnell im Dünndarm resorbiert, Chamazulencarbonsäure (2) wird freigegeben und erreicht eine Plasmakonzentration von 1.7 µg/ml nach 2½ Stunden. Vier bis fünf Stunden nach der Einnahme steigt die Chamazulencarbonsäure-Konzentration im Plasma auf 2.4 µg/ml. Ein Double-Peak Phänomen wurde nach oraler Gabe von Arzneistoffen auf nüchternen Magen registriert.^{107,108} Beim Fasten zeigt der Magen-Darm-Trakt ein zyklisches Kontraktionsmodell, was die Magenentleerungsrate stark beeinflusst. Der Zyklus besteht aus drei Phasen. Eine Ruhephase (Phase I) dauert 1-3 Stunden, gefolgt von Aktivphasen (Phasen II/III) mit kräftiger Kontraktion und einer Dauer von ca. 5-30 Minuten (IMMC, Interdigestive Migrating Motor Complex), was zu Magenentleerung führt. Dies kann, je nachdem in welchem Stadium des Kontraktionsmodells sich der Magen befindet, dazu führen, dass nur ein Teil der Dosis in den Dünndarm – den Hauptabsorptionsort – abgegeben wird. Der zweite Teil der Dosis kann erst nach der nächsten Kontraktion absorbiert werden. Dies hat einen Double-Peak im Plasmaspiegel eines Stoffs zur Folge.¹⁰⁷ Zum anderen könnte der Double-Peak durch einen eventuellen enterohepatischen Zyklus von Chamazulencarbonsäure erklärt werden. Die zirkulierende Chamazulencarbonsäure könnte einen stabilen mizellulären Komplex mit den Gallensalzen bilden, der sich aber im distalen Ileum auflöst, denn dort werden die Gallensalze rückresorbiert und Chamazulencarbonsäure zur Absorption freigegeben.^{107,108} Diese Hypothese kann man ohne vergleichende kinetische Analysen von Chamazulencarbonsäure nach i.-v.-Gabe nicht ausschließen.

Außerdem könnte es sich durch die hohe Lipophilie des Esters erklären, der sich möglicherweise an Eiweiße in Dünndarmzellen gebunden und Chamazulencarbonsäure (2) dann über einen längeren Zeitraum kontinuierlich freigegeben hat. Durch Veresterung von Arzneistoffen mit Pivalinsäure wird die Resorptionsrate eines hydrophilen Stoffs erhöht. Im Falle der Chamazulencarbonsäure (2) wurde der Ester, welcher sich als unbedenklich erwies, aufgrund der Instabilität von (2) im Magenmilieu verabreicht.¹¹

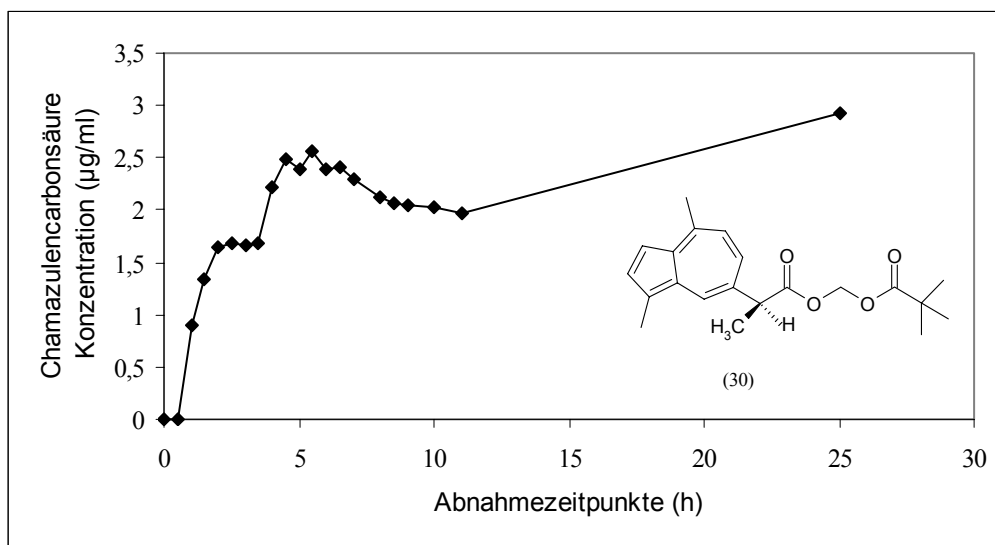


Abb. 4.6: Chamazulencarbonsäureplasmaspiegel nach oraler Gabe von 300 mg Chamazulencarbonsäureoxymethylpivalylester (30) und Blutabnahme im Zeitraum von 12 Stunden und nach 25 Stunden.

Der nächste Abfall der Chamazulencarbonsäure-Konzentration ist sehr langsam, was zum einen durch die langsame Elimination und eine hohe Proteinbindung erklärt werden kann. 25 Stunden nach der Einnahme von (30) wurde ein überraschender erneuter Anstieg des Chamazulencarbonsäureplasmaspiegels festgestellt.

Die Plasmaproben wurden qualitativ und semiquantitativ mittels LC gekoppelt mit dem Massenspektrometer untersucht. Diese Untersuchung hat die mit dem verwendeten Photodiodenarray-Detektor ermittelten Ergebnisse bestätigt. Es handelte sich bei den Messungen von Plasmaproben nicht um Metabolite der Chamazulencarbonsäure, die die Ergebnisse verfälschen könnten (s. Abb. 4.7).

In einer zweiten Variante wurden die Plasmaproben auch mittels LC-MS/MS qualitativ untersucht, ob Oxymethylpivaloyl ester absorbiert wurde, sich dann in Körperzellen oder in Fettgewebe gespeichert hat und langsam abspaltete. Bei der verwendeten Methode, also bei einer Nachweisgrenze von 0.4 ng/ml konnte kein Oxymethylpivaloyl ester (30) im Plasma nachgewiesen werden (s. Abb. 4.8).

Wäre Chamazulencarbonsäure (2) im Fettgewebe und in Körperzellen gebunden an Lipide und/oder Proteine gespeichert, was durch ihre Lipophilie denkbar ist, so würde ein Teil der Dosis von (30) noch aus dem distalen Ileum und Dickdarm aufgenommen werden. Diese Hypothese ist denkbar, da z.B. Ibuprofen langsam in den Synovialraum penetriert und dort länger in höheren Konzentrationen verbleibt, nachdem die Wirkspiegel im Plasma bereits abgefallen sind.¹⁰¹ Zum anderen wurde beim Fasten eine gesamte Verweildauer von Ibuprofen im Magen-Darm-Trakt von 18 bis über 24 Stunden und eine merkbare Absorption aus dem Dickdarm festgestellt.¹⁰⁹

Dies sind jedoch Hypothesen, die im Rahmen dieser Arbeit und mit der vorhandenen Probandenzahl (ein Proband) nicht befriedigend beantwortet werden können.

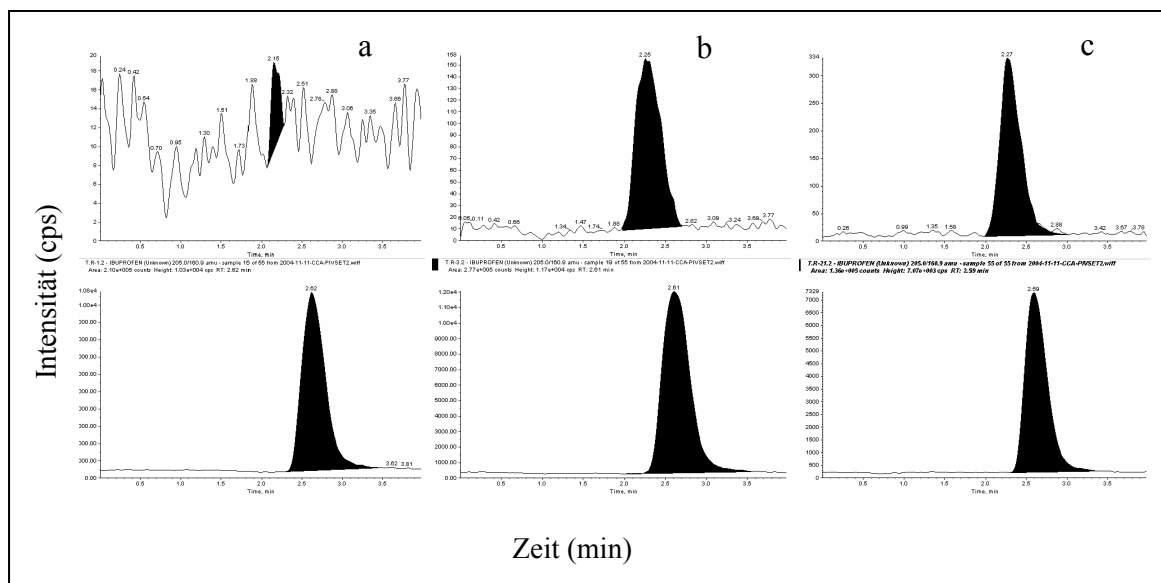


Abb. 4.7: Chromatogramme der Plasmaproben nach oraler Gabe von (30) detektiert mit MS. Die oberen Chromatogramme von Chamazulencarbonsäure, die unteren von Ibuprofen (I.S.). a: Vor der Gabe. b: 1 h nach der Gabe. c: 25 h nach der Gabe.

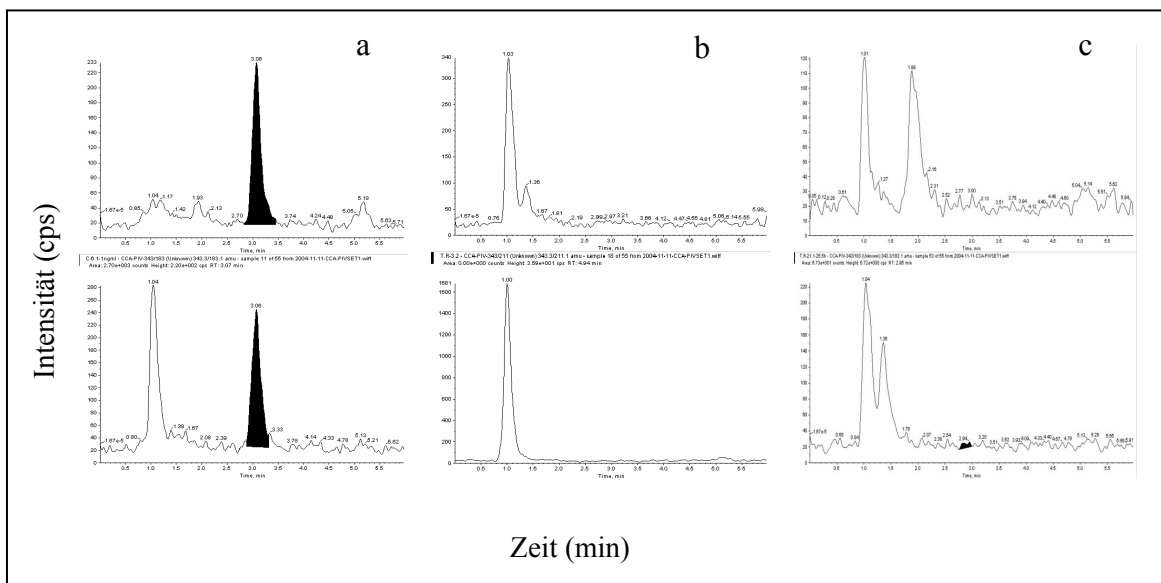


Abb. 4.8: Chromatogramme zur Plasmaproben-Untersuchung auf Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure (30) detektiert mit MS. Oben ist Detektion der Fragmente mit m/z: 343/211, unten mit m/z: 343/183. a: Oxymethylpivaloyl ester-Standard (1 ng/ml), b u. c: Plasmaproben 1 h und 25 h nach oraler Gabe von (30).

4.6 Einfluss auf die Arachidonsäure-Kaskade

Da nach oraler Gabe des Matricins Chamazulencarbonsäure bioverfügbar ist, welche nach in-vitro-Versuchen selektive Cyclooxygenase-2-Hemmeigenschaften zeigte, lag es nahe, einen eventuellen Effekt von Matricin (1) und Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester (30) auf die Arachidonsäure-Kaskade zu untersuchen.

Innerhalb der Arachidonsäure-Kaskade katalysieren Cyclooxygenasen die Metabolisierung der Arachidonsäure (31) über Prostaglandin G₂ (32) und Prostaglandin H₂ (33) zu zahlreichen Verbindungen wie Prostaglandin F_{2α} (34), D₂ (35), E₂ (36), I₂ (37), Thromboxan A₂ (38) und Thromboxan B₂ (39) (s. Abb. 4.9).¹¹⁰

Die Prostaglandine 13,14-Dihydro-15-keto PGE₂ (40) und 11-Dehydro-thromboxan B₂ (41) wurden aus Na-Citrat/Indomethacin-Plasma nach Matricingabe bestimmt.

11-Dehydro-thromboxan B₂ (11-dh-TxB₂) (41) ist ein Hauptmetabolit von Thromboxan B₂, das wegen seiner längeren Halbwertszeit ($t_{1/2} = 45$ Minuten verglichen mit Thromboxan B₂ $t_{1/2} = 5-7$ Minuten) als Maß für die systemische Thromboxan-Produktion angesehen wird.¹¹¹

13,14-Dihydro-15-keto-PGE₂ (DHKE2) (40) ist ein Maß für das endogene systemische PGE₂. Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen die Plasmaspiegel von 11-dh-TxB₂ (41) und DHKE2 (40) nach Gabe von Matricin.

PGE₂ (36), PGE-M (43) und 11-Dehydro-thromboxan B₂ (41) sind jeweils ein Maß für die renale Prostaglandin-Produktion, für die systemische PGE₂-Produktion und für die systemische COX-1 abhängige Thromboxan-Produktion. Sie wurden in 24-h-Sammelurinen bestimmt und zwar vor, während und nach Einnahme von Matricin (1) und dem Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure (30).

Die Ergebnisse der prozentualen Abweichungen von Prostaglandinexkretionsraten in 24-Stunden-Sammelurinen nach oraler Gabe von (1) und (30) sind in Abbildung 4.12 und 4.13 dargestellt.

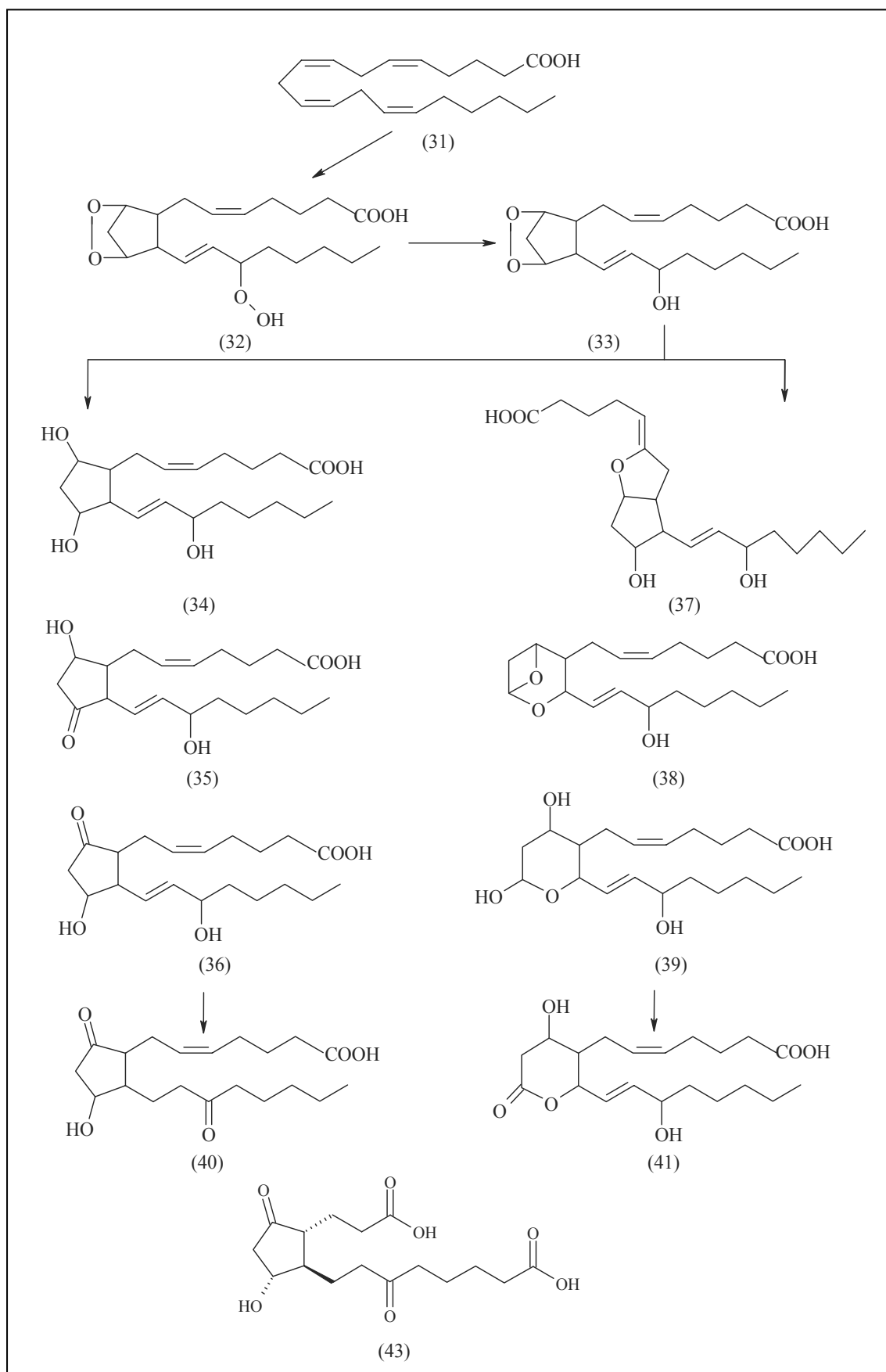


Abb. 4.9: Arachidonsäurestoffwechsel, Biosynthese von Cyclooxygenaseprodukten.

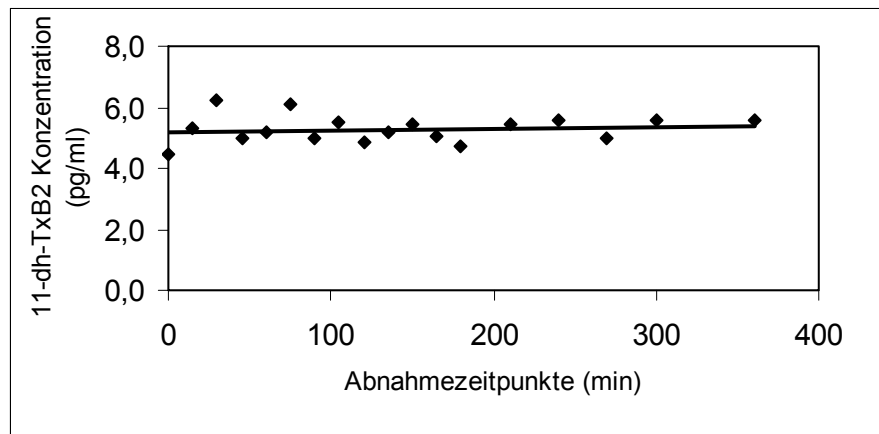


Abb. 4.10: 11-Dehydro-thromboxan B₂-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 500 mg Matricin.

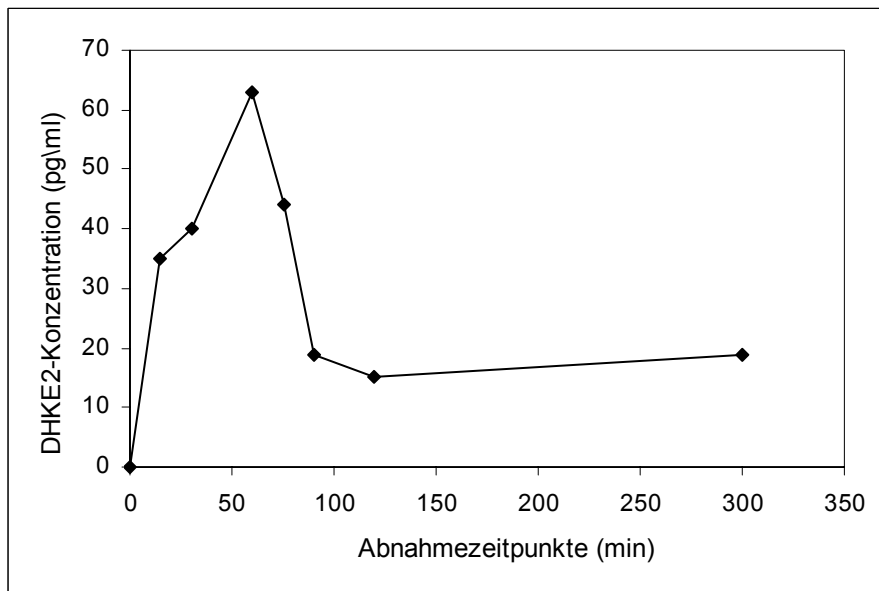


Abb. 4.11: 13,14-Dihydro-15-keto-PGE₂-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 500 mg Matricin.

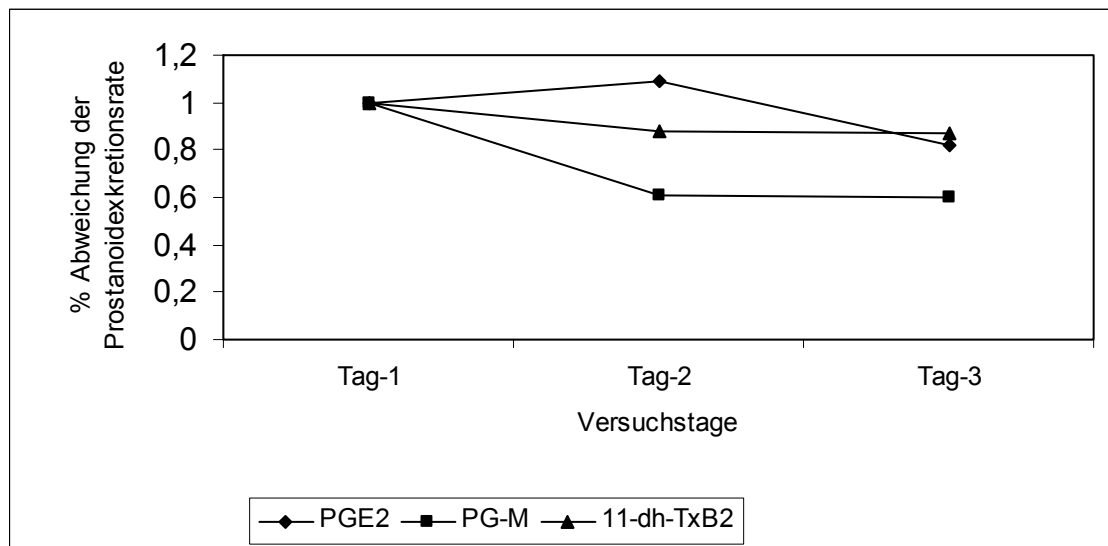


Abb. 4.12: Die prozentualen Abweichungen der Prostanoidexkretionsrate nach oraler Gabe von 500 mg Matricin.

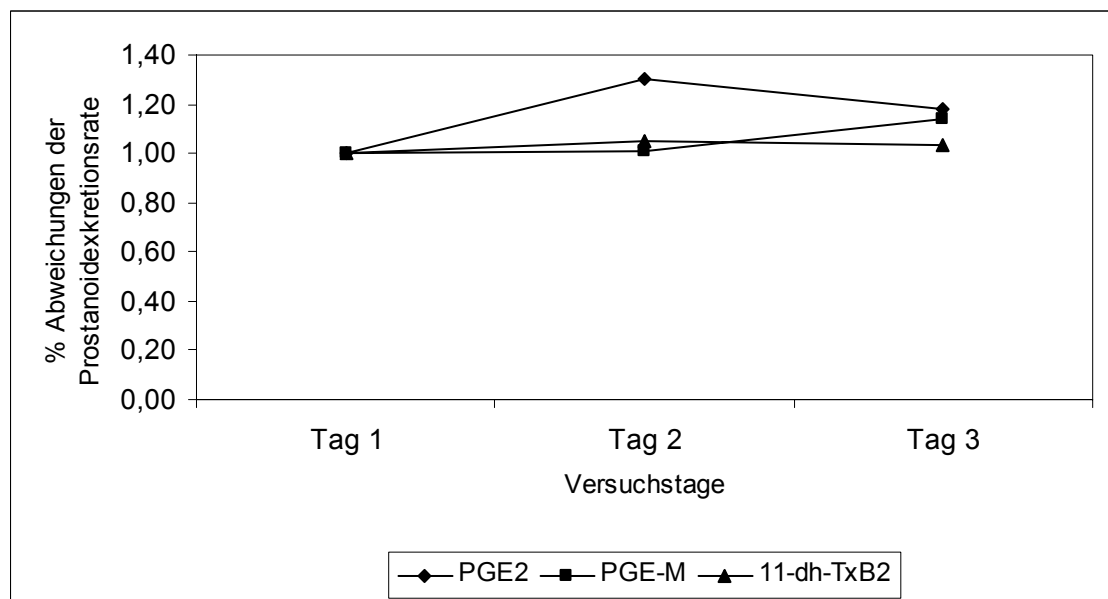


Abb. 4.13: Die prozentualen Abweichungen der Prostanoidexkretionsrate nach oraler Gabe von 300 mg Oxymethylpivaloyl ester der Chamazulencarbonsäure (30).

4.6.1 Ergebnisse und Diskussion

Nach oraler Gabe von Matricin (1) konnten keine Effekte auf die Thromboxan-Produktion im Blut oder im Urin festgestellt werden.

Auch nach der Einnahme des Oxymethylpivaloylesters der Chamazulencarbonsäure (30) konnte kein Effekt auf die Thromboxan-Produktion im Urin festgestellt werden.

Der 11-Dehydro-thromboxan-B₂-Spiegel (41) wird aber normalerweise durch COX-2-selektive Inhibitoren nicht beeinflusst,¹¹² und Chamazulencarbonsäure (2) ist ja ein solcher (s.o.).

Die Plasmakonzentration von DHKE2 (40) war zunächst angestiegen, was auf die Blutabnahme zurückzuführen sein könnte. Das anschließend erfolgte Absinken lässt sich mit dem Chamazulencarbonsäure-Plasmakonzentrationsprofil nicht deuten.

Die renalen Exkretionsraten von PGE₂ lassen keine nennenswerten Unterschiede im Gefolge der Gabe von Matricin (1) oder dem Ester (30) feststellen.

Das signifikante Absinken um 40% der renalen Exkretionsrate von PGE-M, dem Hauptmetabolit der E-Serien PGE₁ und PGE₂, weist auf eine systemische PG-Synthese-Inhibition hin.

Nach der Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester (30) kann kein absenkender Einfluss auf die renalen Exkretionsraten von PGE₂ und PGE-M festgestellt werden.

Die PGE₂-Synthese wird spezifisch von synthetischen COX-2 Inhibitoren wie z.B. Rofecoxib in einer Plasmakonzentration von 120 ng/ml bei Patienten mit Hyperprostaglandin-E-Syndrom/antenatales Bartter-Syndrom um 60% reduziert.¹¹³

Als Gründe für einen fehlenden Einfluss auf PGE₂ nach oraler Gabe von Matricin (1) oder dem Ester (30) könnte einerseits die schwankende Prostaglandin-Synthese sowie die kurze Halbwertszeit von Chamazulencarbonsäure, verglichen mit dem synthetischen selektiven COX-2 Hemmer, sein. Andererseits ist der Effekt eine Frage der Konzentration am Wirkort.

Die COX-2 ist physiologisch in niedriger Konzentration konstitutiv in der Niere vorhanden, und man muss mit 20% interindividuellen Unterschieden in der Enzym-Expression rechnen.¹¹⁴

Chamazulencarbonsäure hat eine Halbwertszeit von 4 Stunden, während Rofecoxib eine von 12 Stunden hat.¹¹⁵

Außer dem Einfluss auf PGE-M nach der Gabe von Matricin (1) sind keine weiteren Effekte nachgewiesen. Dies lässt keine Aussage in Hinblick auf die Hemmung der Entzündungsmediatoren zu. Aufgrund der statistischen Unsicherheit bei nur 4 Probanden im Rahmen dieser Arbeit lässt sich ein Effekt auf Cyclooxygenase-abhängige Mediatoren jedoch nicht gänzlich ausschließen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Matricin ist ein lange bekanntes antiphlogistisch wirkendes Proazulen der Kamille. Weil Matricin eine labile Substanz - besonders im sauren Milieu des Magensaftes – und somit eine mögliche Vorstufe für den selektiven COX-2-Inhibitor Chamazulencarbonsäure nach oraler Gabe ist, war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob Chamazulencarbonsäure nach Gabe von Matricin bioverfügbar ist und eine Rolle bei der Wirkung von Matricin spielt. Erstes wurde erfolgreich gezeigt, zweites als sehr wahrscheinlich nahegelegt.

Zuerst wurde Matricin in großen Mengen aus Kamillenblüten extrahiert. Die Extraktion gilt als sehr aufwändig. Hierfür wurde das nach Stahl angewandte Extraktionsverfahren etabliert und die kritischen Schritte der Isolierung optimiert. Dadurch konnte die Arbeitszeit und der Verbrauch an Umwelt schädigenden chlorierten Lösungsmitteln verringert werden. Gleichzeitig wurde die schwierige folgende Umkristallisation erleichtert, so dass 2.0 g Matricin in reiner kristalliner Form erhalten wurden.

Zur quantitativen Bestimmung von Matricin in Drogen und Extrakten wurde eine In-situ-Methode entwickelt und validiert. Die Methode hat den Vorteil des geringen Verbrauchs an Lösungsmitteln und teuren Geräten und hatte eine für unsere Zwecke sehr gute Präzision und Selektivität.

In-vitro-Untersuchungen des Matricins hatten gezeigt, dass Matricin sich zu 50% nach 30minütiger Behandlung mit künstlichem Magensaft in die Chamazulencarbonsäure umwandelte.

Ein spezifischer HPLC-Assay zur quantitativen Bestimmung von Chamazulencarbonsäure im Plasma wurde entwickelt und validiert. Chamazulencarbonsäure wurde aus 100 µl Plasma nach Ansäuern mit 0.01 M H_3PO_4 mit Diisopropylether extrahiert. Als interner Standard diente Ibuprofen. Die Methode wurde in einem Konzentrationsbereich 0.1-30 µg/ml kalibriert. Zur Validierung der Methode wurde die Präzision in der Serie (intra assay precision) und von Tag zu Tag (inter assay precision) untersucht. Die Bestimmungsgrenze der Methode lag bei 0.1 µg/ml. Die Methode erwies sich als präzise, richtig, spezifisch und empfindlich.

Die validierte HPLC-Methode wurde bei der humanpharmakokinetischen Studie angewandt. 500 mg Matricin und 300 mg Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl-ester als Chamazulen-carbonsäure-Prodrug wurden oral von gesunden Probanden eingenommen und Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen. Gleichzeitig wurden Prostaglandin, 11-Dehydro-thromboxan B₂ und 13,14-Dihydro-15-keto-PGE₂ im Plasma sowie PGE₂, PGM und 11-Dehydro-thromboxan B₂ im Urin bestimmt, um einen eventuellen Einfluss auf die Arachidonsäure-Kaskade festzustellen.

Chamazulencarbonsäure war nach der oralen Gabe beider Substanzen tatsächlich verfügbar. 15 Minuten nach oraler Gabe von Matricin erschien Chamazulencarbonsäure im Blut und erreichte nach 75-90 Minuten ein Konzentrationsmaximum von 1.3-2.2 µg/ml. Die berechneten Pharmakokinetik-Parameter zeigen ein etwas größeres Verteilungsvolumen und eine langsamere Elimination verglichen mit Ibuprofen.

Erst 1 h nach oraler Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl-ester wurde Chamazulencarbonsäure nachgewiesen, da der Ester zuerst im Dünndarm gespalten werden muss. Nach 2½ h wurde das Konzentrationsmaximum von 1.7 µg/ml erreicht. 5 h nach der Einnahme stieg die Konzentration auf 2.4 µg/ml. Die Elimination erfolgte sehr langsam, aber 25 h nach der Einnahme lag die Plasma-Konzentration bei 2.9 µg/ml. Es konnte kein Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl-ester im Blut nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass Chamazulencarbonsäure einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt und/oder sich in Fettgewebe einlagert und von dort allmählich mobilisiert wird.

Die Prostaglandin-Bestimmungen im Blut und Harn lassen keine deutliche Aussage über den Einfluss auf die Arachidonsäure-Kaskade zu. Die Prostaglandin-Plasmaspiegel wurden nach der Gabe von Matricin nicht beeinflusst. Die renale Exkretionsrate von PGE-M ist nur nach Matricin-Gabe um 40% gesunken, was auf eine systemische Prostaglandin-Synthese-Inhibition hinweist. Ein Einfluss auf die Prostaglandin-Synthese nach der Gabe des Oxymethylpivaloyl-esters der Chamazulencarbonsäure wurde aber nicht nachgewiesen.

Chamazulencarbonsäure wurde auch im Hinblick auf ihre Stereochemie und Auxinwirkung untersucht. Die aus *Stevia serrata* Cav. extrahierte Chamazulencarbonsäure wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Sie ist im Gegensatz zu Chamazulencarbonsäure aus *Matricaria* und *Achillea* R-konfiguriert.

Wegen der Ähnlichkeit von Chamazulencarbonsäure mit pflanzlichen Auxinen wie β-Indolyl-essigsäure wurde sie mittels eines Bioassays (Ethylenproduktion aus Pflanzenkeimlingen) auf Auxin- oder Auxin-hemmende Wirkung untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass Chamazulencarbonsäure die Funktion eines Auxins haben könnte.

Im Rahmen der Arbeiten mit Chamazulencarbonsäure wurden die folgenden ähnlichen Azulene synthetisiert: 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol, 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-2-ol, 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionaldehyd, 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-ethanon, 7-(2-Hydroxypropyl)-4-methylazulen-1-carbaldehyd, 7-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-4-methylazulen-1-carbaldehyd und 7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd. Insbesondere gelang, wenn auch in sehr geringer Ausbeute, die Synthese des in Kamille vorkommenden Azulenaldehyds Chamaviolin in einem Schritt aus Chamazulen.

Kapitel 6

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, dass Chamazulencarbonsäure eine Rolle bei der Wirkung von Matricin spielt. Die Verfügbarkeit dieses selektiven COX-2-Inhibitors eröffnet ein neues Forschungsgebiet zur Verwendung von Kamille zur kolorektalen Krebsprophylaxe. Denn seit Anfang der 90iger Jahre ist bekannt, dass nicht-steroidale Antirheumatika die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms vermindern können. Diese Antitumor-Aktivität wird wahrscheinlich über COX-2 vermittelt. Eine Überexpression der COX-2 wurde für verschiedene Karzinome beschrieben.¹¹⁶⁻¹¹⁹

Dies könnte die tierexperimentellen Untersuchungsergebnisse von Kraul und Schmidt (1957)¹²⁰ erklären, die auf eine Beeinflussung der Kanzerogenese bzw. Hemmung einer Metastasierung durch Azulen oder seine Derivate hinwiesen.

Die Tatsache, dass S-Chamazulencarbonsäure selektiv COX-2 hemmt, gibt auch durch den Vergleich mit den Wirkungen anderer COX-2-Inhibitoren Anlass zu der Vermutung, sie könnte analgetisch wirken, was in einem geeigneten Tiermodell zu testen wäre.

Nach dem Nachweis der R-Konfiguration von Chamazulencarbonsäure aus *Stevia serrata* Cav. ist es von Interesse, R-Chamazulencarbonsäure in ausreichender Menge zu gewinnen und in-vitro-Tests auf Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität sowie in vivo auf Entzündungshemmung oder Analgesie durchzuführen. Dies wird Aufschluss darüber geben, ob R-Chamazulencarbonsäure antiphlogistisch und analgetisch oder jedoch nur analgetisch wie R-Flurbiprofen wirkt, dessen Analgesie durch eine enzymatische Blockierung der bekannten COX-Isoenzyme nicht zu erklären ist.

Nachdem durch unsere Arbeiten Chamaviolin zur Verfügung steht, ist es interessant zu testen, ob dieser in der Kamille vorkommende Azulenaldehyd zur antiphlogistischen Wirkung der Kamille beiträgt.

Zur Erklärung der Pharmakokinetik von Chamazulencarbonsäure nach der Gabe ihrer Oxymethylpivaloyl-ester können Tierexperimente durchgeführt werden.

Da nach der Gabe von Matricin in einer Dosis von 500 mg, die in keinem Kamillenpräparat erreicht wird, keine signifikanten Einflüsse auf die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten festgestellt werden konnten, muss nun in Tierversuchen untersucht werden, in welcher Kombination Matricin mit anderen antiphlogistisch wirkenden Kamilleninhaltsstoffen, insbesondere (-)- α -Bisabolol und Apigenin-7-glucosid, die höchste Wirkung erreicht.

Chamazulencarbonsäure wird nicht nur nach der Gabe des Kamillen-Proazulens Matricin, sondern auch durch die Einnahme der Schafgarben-Proazulene bioverfügbar sein.

Da die konventionelle Verwendung der Kamillenblüten als Teezubereitung nur eine sehr geringe Menge an Matricin aufweist,¹²¹ kann man, um eine Wirkung über die Chamazulencarbonsäure zu erzielen, proazulenreiche Achillea-Extrakte verwenden. Eine quantitative Bestimmung von Chamazulencarbonsäure im Plasma könnte man nach der Verwendung von fertigen Achillea-Präparaten durchführen, die bei Verwendung der prozulenreichen Achillea collina höhere Plasmaspiegel erwarten lassen.

Kapitel 7

Experimenteller Teil

7.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Bezifferung der Kohlenstoffe in der Bezeichnung der Azulene und die Zählweise in der Formeldarstellung unterscheiden sich. Während die Bezifferung in der Bezeichnung gemäß Beilstein (Autonom) durchgeführt wurde, wurde bei der Formeldarstellung des Azulensystems nach der in der Literatur gebräuchlichen Weise beziffert, um mit Literaturdaten vergleichen zu können.

7.1.1 Allgemeines

Es wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet, deren Reinigung und Trocknung nach den gängigen Standardmethoden der Literatur erfolgte.

Die Ausbeuteangaben beziehen sich auf die säulenchromatographisch gereinigten bzw. umkristallisierten Produkte.

7.2 Analytik

7.2.1 Allgemeine Methoden

Infrarotspektroskopie (IR) erfolgt mit dem FT-IR-Spektrometer 510 P der Fa. Nicolet. Die Verbindungen wurden als KBr-Pressling oder als Film zwischen NaCl-Platten vermessen. Die Bandenlagen sind in cm^{-1} angegeben.

Massenspektroskopische Bestimmungen (MS) und hochaufgelöste Massen-spektrometrie (HRMS) wurden mit einem doppelfokussierenden Sektorfeld Massenspektrometer vom Typ VG 7070H der Fa. Vacuum Generators oder einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-AutoSpec der Fa. Micromass vorgenommen. Die Datenakquisition erfolgte mit dem Datensystem „Vektor1“ der Fa. Teknivent Corp. Angegeben sind Molekülion (M^+), Proben temperatur und einige charakteristische Bruchstücke (m/z = Masse/Ladungsverhältnis) sowie deren relative Intensität in Prozent, bezogen auf den Basispeak. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoß (EI, 70 eV).

NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern JEOL GX-400 (399.79 MHz für ^1H bzw. 100.5 MHz für ^{13}C) und JEOL Eclipse+ 500 (500.00 MHz für ^1H bzw. 125.65 MHz für ^{13}C) aufgenommen. Die Spektren wurden auf Tetramethylsilan (TMS) oder das Signal des deuterierten Lösungsmittels kalibriert.

Die angegebenen Werte der Kopplungskonstanten (Hz) stellen Beträge dar und sind mit einem Fehler behaftet (z.B. ± 0.2 Hz bei 400 MHz).

Die Signalmultiplizitäten werden mit folgenden Symbolen gekennzeichnet:

S: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quadrett, m: Multiplett, br s: breites Singulett, dd: Dublett vom Dublett.

Für die Aufnahmetechnik der ^{13}C -NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen verwandt:

APT Attached Proton Test

COSY Correlation Spectroscopy

Die Spektrenbearbeitung erfolgte mit dem Delta NMR Processing Programm Version 4.2.3 der Fa. Jeol USA.

Elementaranalysen wurden mit einem CH-Analyzer nach Dr. Salzer der Fa. Labormatic/Wösthoff und mit einem CHN-Autoanalyzer 185 der Fa. Hewlett-Packard (nur für N-Analysen) ausgeführt. Die Angabe aller ermittelten Werte erfolgt in Prozentzahlen.

Schmelzpunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop HM-LUX der Fa. Leitz ermittelt und sind nicht korrigiert.

UV-Spektren wurden mit einem UV-2101 PC Spektralphotometer der Fa. Shimadzu bei Raumtemperatur aufgenommen, angegeben sind die Absorptionsmaxima (λ_{\max}) in nm sowie der molare Extinktionskoeffizient (ϵ).

pH-Wert-Messungen wurden mit einem CG822 pH-Meter der Fa. Schott durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach 2-Punkt Kalibrierung. Das Gerät wurde vor jeder Messung mit Pufferlösungen von pH 4.00, pH 7.00 und pH 9.00, alle Fa. Merck, kalibriert.

7.2.2 DC-Scanner

Gerät: Shimadzu CS-930, Messwellenlänge: 244 nm, Messanordnung: Remission, UV: Deuterium-Lampe und Scan: Zick-zack-Scan.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Fertigplatten (20*20 cm, Dicke 0.25 mm, Fa. Merck).

Mobile Phase: Chloroform/Ethylacetat (5:1 V/V) mit Kammersättigung 15 Minuten.

Laufstrecke: 16 cm.

Auftragsvolumen: 1 µl der Standard- und Probenlösungen in Chloroform.

Auswertung: Die Berechnung der Konzentration erfolgt über die Regressionslinie der Peakintegrale (area under the curve, AUC) aus dem arithmetischen Mittel dreier Einzelbestimmungen von Matricin Standard in einem Bereich von 0.1-0.5 µg/Fleck. Die Regressionslinie wurde mit Hilfe des Programms Microsoft Excel berechnet.

7.2.2.1 Probenvorbereitung und Standardlösungen

Probenvorbereitung von Kamillendroge

5 g Kamillendroge, genau eingewogen, mit einer Stengellänge kleiner als 1.0 cm, wurden mit 500 ml Chloroform (1:10) auf dem Magnetrührer 60 Minuten bei Raumtemperatur mazeriert.

Die Extrakte wurden über Glaswatte filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde in 25 ml Chloroform aufgenommen.

Probenvorbereitung zur Optimierung der Mazerationszeit

15 g Kamillenblüten wurden genau abgewogen und mit 100 ml Chloroform 5, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480 und 720 Minuten lang auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur mazeriert. Die Extrakte wurden über eine Glaswatte filtriert und eingeeengt. Die Rückstände wurden in 50.0 ml Chloroform aufgenommen. Davon ist je 1 µl aufgetragen worden.

Probenvorbereitung zur quantitativen Bestimmung von Matricin bei den Isolierungsschritten

Sechs Portionen zu je 300 g Kamillenblüten mit einem Matricingehalt von 1.8 mg/g Droge wurden mit Chloroform 1.5 Stunden lang bei Raumtemperatur extrahiert.

Die Extrakte wurden über Glaswatte filtriert und eingeeengt. Eine Portion wurde mit Methanol und eine zweite mit Petrolether behandelt. Nach Filtration wurde das Filtrat eingeeengt. Die nächsten zwei Portionen wurden ebenso bearbeitet, anschließend chromatographiert und die matricinreichsten Fraktionen eingeeengt. Die letzten beiden Portionen wurden wie oben behandelt, chromatographiert und anschließend mit KHCO_3 2% und Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden eingeeengt. Die Rückstände wurden in 10 ml Chloroform gelöst. Die Lösungen wurden 1:100 verdünnt, davon wurde je 1 µl auf die DC-Platte aufgetragen.

Herstellung der Standardlösungen

25 mg Matricin Standard wurden in einem 50.0 ml Messkolben in Chloroform gelöst (50 mg %). 8.0, 6.0, 4.0 und 1.0 ml dieser Lösung wurden zu 10.0 ml in Messkolben mit Chloroform verdünnt. Die Lagerung der hergestellten Lösungen erfolgte in dicht schließenden Gläsern bei -20 °C.

10 mg Chamazulencarbonsäure wurden in einem 10.0 ml Messkolben in Methanol gelöst (100 mg %). 3.0 und 1.5 ml dieser Lösung wurden zu 5.0 ml in Messkolben mit Methanol verdünnt. Die Lagerung der hergestellten Lösungen erfolgte in dicht schließenden Gläsern bei -20 °C.

7.2.2.2 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden je Verdünnung (10-50 mg %) drei Einzelbestimmungen durchgeführt. Die arithmetischen Mittelwerte der Peakflächen dienten zur Bestimmung der Kalibrierkurve.

7.2.2.3 Validierung

Präzision

Je Verdünnung wurde sechsmal 1 µl aufgetragen und die Peakflächen bestimmt. Aus den Messwerten wurden der Mittelwert und die relative Standardabweichung berechnet.

Die Nachweisgrenze

Fünfmal wurde eine Blindprobe aufgetragen und gescannt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Blindproben wurden berechnet. Die dem Signal von Blindwert und dessen sechsfacher Standardabweichung entsprechende Konzentration gibt die Nachweisgrenze an.

Die Bestimmungsgrenze

Das Signal vom Blindwert und dessen dreifacher Standardabweichung gibt das minimale quantitative Signal an. Über die Kalibrierkurve wurde die Bestimmungsgrenze ermittelt.

7.2.2.4 In-vitro-Untersuchungen des Matricins

5 mg Matricin wurden in 10 ml Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Je zweimal 2 ml der Lösung wurden mit 2 ml eines nach USP⁸⁶ frisch hergestellten künstlichen Magensaftes versetzt und 30 min lang im Ölbad bei 37 °C auf dem Magnetprüher behandelt. 2 ml des Magensaftes wurden mit 2 ml Wasser versetzt und wie oben behandelt und diente als Blindprobe. Die milchig blaue Lösung wurde mit 15 ml Wasser verdünnt. Anschließend wurde sie mit je dreimal 20 ml Chloroform extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das MgSO₄ wurde mit Chloroform nachgewaschen. Diese Chloroformfraktion wurde zusammen mit den Chloroformextrakten eingeengt. Der Rückstand wurde in 0.5 ml Methanol aufgenommen und davon wurden je zweimal 1 µl auf die Platte zusammen mit Chamazulencarbonsäure-Standardlösungen aufgetragen. Die Messung mit dem DC-Scanner erfolgte bei 290 nm. Zweimal 2 ml der Matricinlösung wurden mit 2 ml eines nach USP⁸⁶ frisch hergestellten künstlichen Dünndarmsaftes versetzt und 60 min lang im Ölbad bei 37 °C auf dem Magnetprüher behandelt. 2 ml des Dünndarmsaftes wurden mit 2 ml Wasser versetzt und wie erstgenannte Lösung behandelt. Sie diente als Blindprobe. Die Lösung wurde mit 15 ml Wasser verdünnt. Anschließend wurde sie dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das MgSO₄ wurde mit Chloroform nachgewaschen und die Chloroformphasen wurden zusammen eingeengt. Die Rückstände wurden in 3 ml Chloroform aufgenommen und davon wurde je zweimal 1 µl auf die Platte zusammen mit Matricin-Standardlösungen aufgetragen. Gemessen wurde bei 244 nm.

Die Werte wurden mit Hilfe der ermittelten Regressionslinien ausgewertet. In den Tabellen 7.1 und 7.2 sind die Mittelwerte der Messergebnisse zusammengestellt. Wie aus Tabelle 7.1 hervorgeht, wurde Matricin (1) nach Behandlung mit künstlichem Magensaft zu 50% in Chamazulencarbonsäure (2) umgewandelt. Nach Behandlung mit künstlichem Dünndarmsaft wurde keine Umsetzung von (1) festgestellt.

Behandlung mit künstlichem Magensaft, S. ist Chamazulencarbonsäure (2)		
Probe	AUC	Berechnete Konzentration mg %
1	363414	73.0
2	357167	71.7
Blind	0	—
S. 100 mg %	487760	—
S. 60 mg %	302885	—
S. 30 mg %	164226	—

Tab. 7.1: In-vitro-Untersuchung von Matricin (1).

Behandlung mit künstlichem Dünndarmsaft, S. ist Matricin (1)		
Probe	AUC	Berechnete Konzentration mg %
1	72346	35
2	76461	37
Blind	0	—
S. 50 mg %	99720	—
S. 30 mg %	62537	—
S. 20 mg %	42363	—

Tab. 7.2: In-vitro-Untersuchung von Matricin (1).

7.2.3 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

7.2.3.1 Geräte

- Gynkotec HPLC-Modell M480.
- *Entgasungseinheit*: Degasser Modell DG-503.
- *Dosierschleife*: 5 µl aus Edelstahl der Fa. Merck.
- *Detektor*: Gynkotec-Photodiodenarray UVD 320S.
- *Steuerung und Auswertung*: Gynkosoftware-Datensystem Version (5.30).

Mobile Phase: Acetonitril/Wasser (pH 3) 4:6. Der pH-Wert wurde mit 5%iger H₃PO₄-Lösung eingestellt.

Säule: Varian Säule 50*2.0 mm C₁₈-A. 3 µm.

Programm: isokratischer Lauf.

Flussrate: 0.2 ml/min.

Einspritzvolumen: 5 µl.

Detektion: Bei den Absorptionsmaxima 221 nm (λ_{\max} von Ibuprofen) und 286 nm (λ_{\max} von Chamazulencarbonsäure (2)).

Auswertung:

Die Berechnung der Konzentration erfolgt über das Peakflächenverhältnis Chamazulencarbonsäure zu Ibuprofen als internem Standard.

7.2.3.2 Chemikalien und Materialien

- Chamazulencarbonsäure (2) wurde aus *Achillea collina* Becker Proa. wie beschrieben extrahiert. Die Reinigung wurde mittels Säulenchromatographie über Kieselgel 60 6-8 Mal wiederholt. Das Fließmittel war n-Hexan/Ethylacetat/Methanol (65:30:5). Die Reinheitsbestimmung erfolgte per HPLC. (2) hat eine Reinheit von 99%.

- Ibuprofen (I.S): S-(+)-2-(4-Isobutylphenyl)-propionsäure 99% der Fa. Aldrich.
- Diisopropylether p.a. der Fa. Merck.
- H_3PO_4 p.a. 85% der Fa. Fluka.
- Wasser hergestellt durch Umkehr-Osmosesystem mit euRO6 der Fa. SG Wasseraufarbeitung und Regenerierstation GmbH.
- Acetonitril p.a. der Fa. Merck.
- weitere Reagenzien sind pro analysi.
- Vacuette[®] K₂E (5 ml) der Fa. Greinerbio-one[®].
- Autonorm[™] tierisches Serum (10 ml) der Fa. SERO AS.

7.2.3.3 Probenvorbereitung und Standardlösungen

Herstellung der internen Standardlösung

15.73 mg Ibuprofen wurden in 5 ml Acetonitril gelöst (Stammlösung 3.15 mg/ml). 0.5 ml dieser Lösung wurden 1:10 mit Acetonitril verdünnt, so dass eine Lösung mit einem Gehalt von 0.31 mg/ml resultiert. Zu jeder 100 µl Probe wurden 10 µl der verdünnten I.S Lösung vor der Extraktion zugemischt.

Herstellung der Chamazulencarbonsäure-Standardlösungen

10 mg Chamazulencarbonsäure-Standard wurden in 5 ml Acetonitril gelöst (Stammlösung 2.0 mg/ml). Daraus wurde mit Acetonitril eine Verdünnungsreihe je 5 ml der Konzentrationen 1, 5, 10, 50, 100, 200 und 300 µg/ml hergestellt. Je 1 ml der Lösung wurde in Eppendorfcups portionsweise bei -80 °C gelagert. Für die Kalibrierungs- und Validierungsversuche wurden 10 µl der verdünnten Lösungen zu 100 µl Blind-Serumprobe (Autonorm[™]) zugegeben.

Vorbereitung der Blutproben

Nach oraler Gabe von 500 mg Matricin (1) wurde ein venöser Zugang gelegt. Je 5 ml Blutproben wurden nach folgendem Zeitschema abgenommen:

0.0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240, 300 und 360 Minuten. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde das EDTA-Plasma gewonnen, in 2 Portionen geteilt und bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Nach oraler Gabe von 300 mg Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester (30) wurde ein venöser Zugang gelegt. Je 5 ml Blutproben wurden nach folgendem Zeitschema abgenommen:

0.0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 510, 540, 600, 660, 720 Minuten und 24 Stunden nach Gabe. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde das EDTA-Plasma gewonnen, in 2 Portionen geteilt und bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

Blut- und Urinproben zur Prostaglandin-Bestimmung

Es wurden je 2 ml Blut nach dem genannten Zeitschema abgenommen und mit 400 µl einer Lösung, die Indomethacin (50 µg/ml) und Na-Citrat 3.8% enthält, um Prostaglandinsynthese und Gerinnung zu unterbinden, gemischt. Anschließend wurden sie 15 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Das Plasma wurde abgetrennt und bis zur Aufarbeitung bei - 80 °C gelagert.

24-Stunden-Urin wurde über 3 Tage gesammelt, und zwar vor, während und nach Einnahme von Matricin (1) und (30).

Die Bearbeitung und Auswertung erfolgte im Eicosanoidlabor des Zentrums für Kind- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg.^{99,100}

Vorbereitung von Plasmaproben

Die Standardlösungen wurden zuerst stehengelassen, bis sie auf Raumtemperatur erwärmt waren, und dann gevortext. Zu 100 µl Plasmaprobe wurden 10 µl interne Standardlösung (0.31 mg/ml) und 500 µl 0.01 M H₃PO₄ zugegeben und 30 Sek. lang gevortext. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln mit 2 ml DIPE, anschließend wurde 10 Minuten lang bei 5 °C und 10000 rpm zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in 2 ml Eppendorfcups überführt und unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C eingengt. Die Rückstände wurden bei -80 °C gelagert.

Vor der Messung wurden die Rückstände im Fließmittel rekonstituiert, indem sie zuerst mit 40 µl Acetonitril gelöst und danach mit 60 µl Wasser verdünnt wurden. Vor dem Einspritzen wurden die fertigen Proben 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert; 10 µl wurden davon in die 5 µl Probenschleife eingespritzt.

7.2.3.4 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde ein tierisches Blind-Serum (AutonormTM) verwendet. Die Kalibrierkurven wurden über einen Chamazulencarbonsäure-Konzentrationsbereich von 0.1-30 µg/ml Serum ermittelt. 100 µl Serum wurden mit 10 µl der verdünnten Lösungen von Chamazulencarbonsäure (2) und Ibuprofen gemischt und wie oben beschrieben extrahiert. Die Ermittlung der Kalibriergeraden erfolgte durch lineare Regression nach der Methode der Minimierung der Summe der quadrierten Abweichungen der Peakflächenverhältnisse Chamazulencarbonsäure (2) zu Ibuprofen gegen die Chamazulencarbonsäure-Konzentrationen.

7.2.3.5 Validierung

Linearität

Steigung, Y-Abschnitt und Korrelationskoeffizient R^2 der Kalibriergeraden wurden mittels fünf voneinander unabhängig ermittelten Kalibriergeraden überprüft.

Präzision und Richtigkeit

Für Präzision und Richtigkeit der Methode in der Serie (Intra Assay) wurden pro Konzentration von Chamazulencarbonsäure sechs Proben extrahiert und gemessen und für dessen Präzision und Richtigkeit von Tag zu Tag (Inter Assay) wurden pro Konzentration drei Proben täglich hergestellt und über fünf Tage wiederholt analysiert.

Der prozentuale Variationskoeffizient als Maß für die Präzision und die prozentuale relative Abweichung als Maß für die Richtigkeit wurden statistisch ermittelt.

Die Wiederfindungsrate

Die Peakflächen von Chamazulencarbonsäure bei unterschiedlichen Konzentrationen nach Extraktion aus Serum wurden mit denen ohne Extraktion verglichen.

7.2.3.6 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Flüssig-flüssig-Extraktion

100 µl Serumproben, die Chamazulencarbonsäure in einer Konzentration von 10 µg/ml enthalten, wurden mit 10 µl verdünnter Ibuprofenlösung I.S. gemischt und mit je 500 µl unterschiedlichen verdünnten Säurenlösungen und Puffer angesäuert. Anschließend wurde mit DIPE extrahiert. Die Effizienz der Extraktion erfolgte durch Vergleich der aus drei Wiederholungen ermittelten Wiederfindungsraten.

Festphasenextraktion

100 µl Serumproben, die Chamazulencarbonsäure in einer Konzentration von 10 µg/ml enthalten, wurden mit 10 µl verdünnter Ibuprofenlösung I.S. gemischt und mit 500 µl 0.5 M Ameisensäure verdünnt. Die untersuchten Kartuschen wurden zuerst mit 500 µl Methanol und danach mit 500 µl Wasser konditioniert. Die Probe wurde auf die Kartusche aufgegeben und 20 min lang via Schwerkraft durchlaufen lassen. Mit je 500 µl Wasser und Hexan wurde nachgespült. Die Elution erfolgte mit 500 µl Methanol. Das Eluat wurde direkt in 1 ml Eppendorfcups aufgefangen und unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C eingengt.

7.2.3.7 Semiquantitative Untersuchung der Plasmaproben nach oraler Gabe von Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester (30)

Herstellung der Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester-Standardlösung

Aus einer 1 µg/ml Chamazulencarbonsäureoxymethylpivaloyl ester-Standardlösung in Acetonitril wurden 100, 50, 10 µl entnommen und mit Acetonitril auf 1 ml verdünnt. Davon wurden je 10 µl zu 100 µl Blind-Serumprobe (AutonormTM) zugegeben, so dass eine Konzentration von 1.0, 0.5, 0.1 ng/ml Plasma entsteht. Die Proben wurden wie unten beschrieben bearbeitet.

Vorbereitung der Plasmaproben

100 µl Plasma wurden mit 10 µl Ibuprofen-Lösung (300 ng/ml) gemischt. Mit 500 µl Wasser wurde es verdünnt. Die Extraktion erfolgte mit je 2*1 ml DIPE. Die obere organische Phase wurde in 1.5 ml Eppendorfcups überführt und unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C eingengt. Die Rückstände wurden bei -80 °C gelagert.

Vor der Messung wurden die Rückstände im Fließmittel rekonstituiert, indem sie zuerst mit 60 µl Acetonitril gelöst und danach mit 40 µl Wasser verdünnt wurden. Vor dem Einspritzen wurden die fertigen Proben 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert; 10 µl wurden davon eingespritzt.

Chromatographische Bedingungen

HPLC-System:	Pekrin Elmer Serie 200 Micropumpen.
Massenspektrometer:	Applied Biosystem API3000 Triple-Quad LC-Tandem MS.
Autosampler:	CTC HTS PAL (CTC Analytics, Zingen, Schweiz).
Ionisierung:	Turbo Ion Interface.
Fließmittel:	Acetonitril/Wasser (8/2)
Flussrate:	200 µl/min.
Temperatur:	Raumtemperatur.

7.2.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die folgende dünnschichtchromatographische Methode wurde dazu verwendet, die einzelnen Schritte bei der Isolierung von Matricin (1) rein qualitativ zu verfolgen und matricinhaltige Fraktionen nach Säulenchromatographie nachzuweisen.

Platten	Kieselgel 60 F ₂₅₄ -DC-Alufolien der Fa. Macherey & Nagel. Kieselgel 60 F ₂₅₄ -DC-Fertigplatten der Fa. Merck.
Fließmittel	Chloroform/tert-Butylmethylether (5:1 V/V), mit Kammersättigung.
Laufstrecke	10 cm.
Detektion	UV, 254 nm. Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz, 5 min bei 105 °C im Trockenschrank erhitzen.
Auftragmenge	5 µl der Extraktlösungen wurden unverdünnt aufgetragen und 1 µl einer Vergleichslösung des Matricins 0.5 mg/ml.

Für weitere dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Alufolien der Fa. Macherey & Nagel verwendet.

7.3 Isolierungen

7.3.1 Isolierung von Matricin (1)

7.3.1.1 Nach optimierter Methode

Herstellung des Chloroformextrakts

300 g Kamillendroge mit einem Matricingehalt von 1.8 mg/g Droge wurden mit Chloroform getränkt und 1½ Stunden unter gelegentlichem Rühren stehengelassen. Die Blüten wurden unter Verwendung eines Büchnertrichters mit Filterpapier und Saugflasche abgetrennt, der Chloroformextrakt (ca. 1.5 l) als Filtrat aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, wobei die Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C war. Das zurückgewonnene Chloroform wurde zur Extraktion weiterer Portionen Kamille verwendet. Man erhielt so 13 g einer gelbbraunen hochviskosen Masse, die beim Kühlen erstarrt.

Vortrennung des Chloroformextrakts

Behandlung mit Petrolether

Das eingeengte Chloroformextrakt wurde auf 30 °C erwärmt und in 400 ml Petrolether unter Rühren eingegossen. Zur restlosen Überführung des Kolbeninhaltes wurde mehrmals mit je 10 ml Petrolether und schließlich zweimal mit je 10 ml Chloroform nachgespült. In dem Petrolether bildete sich eine gelbbraune Fällung, welche mit Hilfe eines Büchnertrichters unter Vakuum abgesaugt wurde. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei 30 °C Wasserbadtemperatur eingeengt. Man erhielt 10.5 g braungelben Rückstand.

Behandlung mit Methanol

Das eingeengte Chloroformextrakt wurde mit 50 ml Methanol versetzt und 20 Minuten im Ultraschallbad digeriert. Die flockig ausgefallenen Blattwachse wurden über eine ca. 5 mm dicke, festgestampfte Schicht Aluminiumoxid (neutral zur SC) über einen Glasfiltertrichter abgesaugt. Der Kolben wurde zweimal mit je 10 ml Methanol nachgespült, und die methanolischen Waschlösungen wurden ebenfalls über die Aluminiumoxidschicht abgesaugt. Das methanolische Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C eingeengt. So erhielt man 5 g eines braungelben Rückstands.

Säulenchromatographie

Die gewonnenen Rückstände nach den Vortrennungen wurden durch Säulenchromatographie gereinigt. Eine Chromatographie-Säule (L = 27 cm, Innendurchmesser = 3 cm) wurde mit Kieselgel zur Säulenchromatographie gepackt (0.063-0.2 mm, Fa. Merck, ca. 200 g). Als Fließmittel wurde zuerst ein Gemisch aus Chloroform und tert-Butylmethylether (5:1) verwendet. Man begann mit dem Auffangen von Fraktionen (50-60 ml) und untersuchte die Fraktionen dünnschichtchromatographisch. Sobald Matricin zu eluieren begann, wurde mit reinem tert-Butylmethylether so lange chromatographiert, bis aufgrund der chromatographischen Fraktionskontrolle festgestellt wurde, dass Matricin aus der Säule vollständig eluiert worden war.

Die vereinigten Fraktionen, ca. 500 ml, wurden eingengt. Der Rückstand betrug 0.65 g, was ca. 5% des Chloroformextrakts entspricht.

Ausschüttelvorgänge

Die Rückstände nach Säulenchromatographie von 4-5 Ansätzen wurden in 300 ml Petrolether im Wasserbad bei einer Temperatur 40 °C gelöst. Die trübgelbe Petroletherlösung wurde in einen 1-Liter-Scheidetrichter gegeben und mit 150 ml 2prozentiger (G/V) Kaliumhydrogencarbonatlösung pH 8.5 vorsichtig ausgeschüttelt. An der Phasengrenzfläche bildete sich keine Emulsion, und die klare, hellgelbe wässrige Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit je 50 ml peroxidfreiem Diethylether extrahiert. Die Etherfraktionen wurden über je 8 g wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingengt. Das Natriumsulfat wurde zweimal mit je 10 ml Diethylether nachgewaschen und die Etherfraktionen ebenfalls eingengt. Die Extraktion der Petroletherlösung wurde insgesamt zwölfmal wiederholt, wobei die Kaliumhydrogencarbonatlösung jeweils wieder verwendet wurde. Aus der wasserfreien Etherlösung schied sich beim Einengen gelbliches **Rohmatricin** kristallin ab.

Nach Umkristallisation aus Diethylether erhielt man gelbliche Matricinkristalle. Sie wurden mit Ether nachgewaschen und die Etherlösung wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und zusammen mit der Mutterlauge zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 0.29 g (57.7% der Ausgangsmenge des Matricins), gelbliche Kristalle.

Al₂O₃-Säulenchromatographie

Das erhaltene Rohmatricin wurde in wenig Chloroform gelöst und auf eine mit 100 g Aluminiumoxid N, Aktivitätsstufe IV, gefüllte Glassäule gegeben. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (99:1, V/V) verwendet. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 200 Tropfen bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 50 Tropfen/min. aufgefangen. Die matricinreichsten Fraktionen wurden durch DC bestimmt, zusammengeführt und eingeeengt. Man erhielt schwach hellgelbe Kristalle.

Durch Umkristallisation aus Diethylether erhält man **weiße Kristalle reinen Matricins**. Sie werden bei -20 °C gelagert.

Ausbeute: 0.26 g (48% der Ausgangsmenge des Matricins), reine weiße Kristalle.

Das Matricin (1) entspricht den unter 7.4 beschriebenen analytischen Daten.

7.3.1.2 Nach Stahl-Methode*Herstellung des Chloroformextrakts*

250 g Kamillenblüten mit einem Matricingehalt von 1.2 mg/g Droge wurden in einem 5-l-Becherglas vollständig mit 2.5 l Chloroform bedeckt und 3 min lang sorgfältig gerührt. Der Extrakt wurde abfiltriert und das in der Droge verbliebene Lösungsmittel in einer hydraulischen Presse (Fischer & Co KG, Norf) bei 100-150 kg/cm² abgepresst und über Glaswatte filtriert. Der Drogenrückstand wurde noch ein zweites Mal auf diese Weise behandelt. Anschließend wurden weitere 250 g Droge wie oben extrahiert. Die Chloroform-extrakte (ca. 9 l) wurden jeweils am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C bis zu ca. 100 g dunkelgrünem, zähflüssigem Extrakt eingeeengt.

Vortrennung des Chloroformextrakts

Unter kräftigem Rühren wurden 400 ml Petrolether (40-60 °C) dem Extrakt zugesetzt, die braungrüne Ausfällung wurde abgesaugt und verworfen.

Ausschüttelvorgänge

Die Petroletherlösung wurde in einen 1-l-Scheidetrichter gegeben und mit 100 ml 2%iger Kaliumhydrogenkarbonatlösung vorsichtig ausgeschüttelt. Die in der wässrigen Phase entstandene Emulsion entmischt sich sehr langsam. Daher musste die Emulsion durch Ultrazentrifugation (Avanti® JA-20, Beckman Coulter) bei 20.000 rpm 15 min lang von der klaren, hellgelben wässrigen Phase abgetrennt und der Petroletherlösung zugeführt werden. Nach Zentrifugieren verblieb an der Phasengrenze immer eine dünne gallertartige Schicht, die getrennt abgelassen und verworfen wurde. Die wässrige Lösung wurde dann dreimal mit je 50 ml peroxidfreiem Diethylether extrahiert. Die Etherextrakte wurden über je 8 g wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeeengt. Das Natriumsulfat wurde zweimal mit je 10 ml Diethylether nachgewaschen und die Etherfraktionen ebenfalls eingeeengt. Die beschriebene Extraktion der Petroletherphase wurde 10-12mal wiederholt, wobei jeweils die gleiche KHCO_3 -Lösung wieder verwendet wurde. Aus der wasserfreien Etherlösung schied sich beim Einengen gelbliches **Rohmatricin** kristallin ab.

Reinigung

Die Reinigung der Kristalle sollte mehrmals mit Ether durchgeführt werden, und zwar wurde wenig Ether auf die Kristalle gegeben und umgeschwenkt. Die überstehende Etherlösung wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein weiteres Gefäß gegeben. Dieses Waschen wurde solange wiederholt, bis die Kristalle weiß gefärbt waren. Beim Einengen der Waschflüssigkeit bildeten sich erneut Kristalle. Die erhaltenen Kristalle wurden ausgekratzt und an der Luft getrocknet.

Ausbeute: 0.30 g (50% der Ausgangsmenge des Matricins), gelbliche Kristalle.

7.3.2 Isolierung von Chamazulencarbonsäure (2)

7.3.2.1 Aus *Achillea collina* Becker PROA.

250 g Schafgarbenkraut, das vor der Extraktion vom Stängelanteil befreit worden war, wurde mit ca. 2 l Chloroform getränkt und 1 h lang extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde unter Verwendung eines Büchnertrichters, Filterpapier und Saugflasche abgetrennt, der Chloroformextrakt als Filtrat aufgefangen und am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C eingeeengt. Es blieb ein grüner Rückstand zurück.

Der Rückstand wurde mit 30 ml 1 N ethanolischer NaOH versetzt und 20 min. lang auf 45 °C erhitzt. Anschließend wurde mit 150 ml Wasser verdünnt und in einen 1-l-Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase mit 10%iger Citronensäurelösung angesäuert (pH 3-4) und anschließend zweimal mit 200 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten Pentanphasen wurden über 10 g wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Der Rohextrakt wurde säulenchromatographisch gereinigt. Das Fließmittelgemisch ist n-Hexan/Ethylacetat/Methanol (65:30:5). Chamazulencarbonsäure (2) hat einen R_F-Wert von ca. 0.4. Chamazulencarbonsäure (2) ist ein tiefblaues Öl mit einem charakteristischen Geruch. Chamazulencarbonsäure (2) entspricht den unter 7.5 beschriebenen analytischen Daten.

Ausbeute: 0.84 g (0.33%), blaues Öl.

7.3.2.2 Aus *Stevia serrata* Cav.

40 g Blüten wurden mit 400 ml Chloroform getränkt und 1 h lang extrahiert. Nach Filtration wurde das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 10 ml 1 N ethanolischer NaOH versetzt und 20 min auf 45 °C erhitzt. Nach Zusatz von 30 ml Wasser wurde dreimal mit je 50 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit 10%iger Citronensäurelösung angesäuert (pH 3-4) und anschließend zweimal mit 25 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten Pentanphasen wurden über 3 g wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Der Rohextrakt wurde mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die stationäre Phase Kieselgelplatte (Kieselgel 60, 20*20 cm, Dicke 0.5 mm, Fa. Merck). Als Fließmittelgemisch wurde n-Hexan, Ethylacetat und Methanol (65:30:5) verwendet. Chamazulencarbonsäure hatte einen R_f -Wert von ca. 0.4 und es wurde die entsprechende Bande in diesem Bereich ausgekratzt, mit Methanol eluiert und filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt.

Ein Chamazulencarbonsäure enthaltendes grünes Öl wurde erhalten, da Chamazulencarbonsäure durch gelbe Fettsäuren verunreinigt war. Der Nachweis erfolgte mittels Massenspektrometrie.

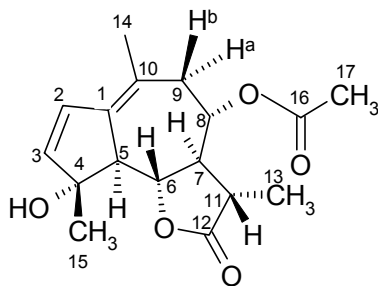
Ausbeute: 0.02 g (0.05%), grünes Öl.

EI-MS (70 eV, 150 °C):

m/z (%) = 229 (100) [$M^+ + 1$], 228 (9.63) [M^+], 183 (18.68) [$M^+ - CO_2H$], 168 (22.47) [$M^+ - CH_3CO_2H$].

Das gewonnene Öl wurde nach der unter 7.7.1 beschriebenen Methode in Chamazulencarbonsäuremethylester umgewandelt, der sich durch DC gut trennt, und sich eindeutig durch 1H -NMR nachweisen lässt.

7.4 (-)-(3S*.3aR*.4S*.9R*.9aS*.9bS*)-4-Acetoxy-2.3.3a.4.5.9a.9b-octahydro-9-hydroxy-3.6.9-trimethylazuleno[4.5b]furan-2-on (Matricin) (1)



Die Bezifferung der Kohlenstoffe in der Bezeichnung der Azulene und die Zählweise in der Formeldarstellung unterscheiden sich. Während die Bezifferung in der Bezeichnung gemäß Beilstein (Autonom) durchgeführt wurde, wurde bei der Formeldarstellung des Azulensystems nach der Literatur gebräuchlichen Weise beziffert, um mit Literaturdaten vergleichen zu können.

Das Extraktionsverfahren zur Isolierung von Matricin (1) wurde unter 7.3.1.1 beschrieben.

Smp. (Zers.): 158-160 °C

UV (0.7 mg% in CH₂Cl₂):

λ_{\max} (lg ϵ) = 245 nm (4.3)

IR (KBr):

ν (cm⁻¹) = 3200, 2900, 1750, 1719, 1260, 1090, 1050, 1000, 980.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 6.32-6.31 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 5.7 Hz), 5.94-5.93 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 5.7 Hz), 4.96-4.94 (dt, 1H, 8-H, ³J_{7,8} = 11.5 Hz, ³J_{8,9a} = 10.3 Hz, ³J_{8,9e} = 3.6 Hz), 4.11-4.07 (t, 1H, 6-H, ³J_{5,6} = 11.0 Hz) 2.92-2.90 (dq, 1H, 5-H, ³J_{5,6} = 11.0 Hz, ⁵J_{5,9a} = 2.1 Hz, ⁵J_{5,14} = 2 Hz), 2.57-2.56 (dq, 1H, 11-H, ³J_{11,7} = 11.5 Hz, ³J_{11,13} = 6.9 Hz), 2.47-2.45 (br dd, 1H, 9a-H, ²J_{9a,9e} = 15.8 Hz, ³J_{8,9a} = 10.3 Hz, ⁵J_{5,9a} = 2 Hz), 2.41-2.40

(dd, 1H, 9e-H, $^2J_{9a,9e} = 15.8$ Hz, $^3J_{8,9e} = 10.3$ Hz), 2.22-2.02 (dt, 1H, 7-H, $^3J_{7,8} = 11.5$ Hz, $^3J_{11,7} = 11.5$ Hz), 2.11 (s, 1H, 17-H), 1.85 (t, 3H, 14-H, $^5J_{14,5} = 2$ Hz), 1.41 (s, 3H, 15-H), 1.34-1.32 (d, 3H, 13-H, $^3J_{11,13} = 6.9$ Hz)

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 177.57 (C-12), 169.94 (C-16), 140.45 (C-3), 136.61 (C-1), 129.95 (C-2), 123.80 (C-10), 84.18 (C-4), 79.32 (C-6), 71.75 (C-8), 58.80 (C-5), 56.58 (C-7), 42.43 (C-9), 40.37 (C-11), 25.16 (C-15), 23.51 (C-14), 21.13 (C-17), 15.40 (C-13).

EI-MS (70 eV, 120°C):

m/z (%) = 228 (100), 288 (64.01) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 185 (62.85), 229 (38.84), 306 (0.68) [M^+].

HR-MS [M^+]: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$

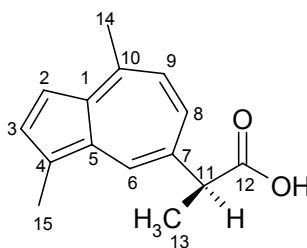
Ber.: 288.1362

Gef.: 288.1348 [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$]

Elementaranalyse: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (306.36)

Ber.: C 66.65 H 7.24

Gef.: C 66.45 H 7.10

7.5 (S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäure (Chamazulencarbonsäure) (2)

Das Extraktionsverfahren zur Isolierung von Chamazulencarbonsäure (2) wurde unter 7.3.2.1 beschrieben.

UV (1.2 mg% in Acetonitril/Wasser 4:6):

λ_{\max} (lg ϵ) = 217 nm (4.0), 244 nm (4.2), 285 nm (4.5)

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3359, 2975, 2928, 2257, 1926, 1700, 1457, 1381, 1330, 1275, 1090, 1050.

¹H-NMR (CDCl₃; 400 MHz):

δ (ppm) = 8.22-8.21 (d, 1H, 6-H, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.64-7.63 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.44-7.43 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.28-7.27 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.00-6.98 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 3.88-3.85 (q, 1H, 11-H, ³J_{11,13} = 7.2 Hz), 2.82 (s, 3H, 14-Me), 2.64 (s, 3H, 15-Me), 1.62-1.60 (d, 3H, 13-Me, ³J_{11,13} = 7.2 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃; 100.5 MHz):

δ (ppm) = 179.21 (C=O), 145.41 (C=C), 137.34 (C=C), 136.71 (C=C), 136.07 (C=C), 135.59 (C=C), 133.74 (C=C), 130.79 (C=C), 126.85 (C=C), 124.95 (C=C), 114.11 (C=C), 48.75 (α -C), 24.07 (14-Me), 18.97 (15-Me), 12.87 (13-Me).

EI-MS (70 eV, 180 °C):

m/z (%) = 229 (22.10) [$M^+ + 1$], 228 (100) [M^+], 183 (99.16) [$M^+ - \text{CO}_2\text{H}$], 168 (59.98) [$M^+ - \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$].

HR-MS [M^+]: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Ber.: 228.1150

Gef.: 228.1158

Elementaranalyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$ (228.28)

Ber.: C 78.97 H 7.06

Gef.: C 78.29 H 7.05

7.6 ^1H -NMR-spektroskopische Shift-Untersuchung mit $\text{Eu}(\text{hfc})_3$

0.001 g Chamazulencarbonsäuremethylester, durch Extraktion und nachfolgende Methylierung gewonnen aus *Stevia serrata* Cav., wurden in 0.3 ml über Molekularsieb getrocknetem CDCl_3 gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.1 ml einer Lösung (10 mg $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ in 1 ml über Molekularsieb getrocknetem CCl_4) gemischt. Ein ^1H -NMR-Spektrum wurde aufgenommen, wobei keine Signalspaltung nachweisbar war.

0.001 g S-Chamazulencarbonsäuremethylester (13), durch Extraktion und nachfolgende Methylierung (s. 7.7.1) gewonnen aus *Achillea collina* Becker, wurden in 1 ml CDCl_3 gelöst. Davon wurden 0.1 ml zu der oben beschriebenen Lösung gegeben. Das Shift-Reagenz wurde zu der Mischung schrittweise, je 0.1 ml, zugefügt. Die Messung wurde bei einer Frequenz von 500 MHz, 256 Scans und einer Temperatur von 15 °C durchgeführt.

^1H -NMR (CDCl_3 ; 500 MHz):

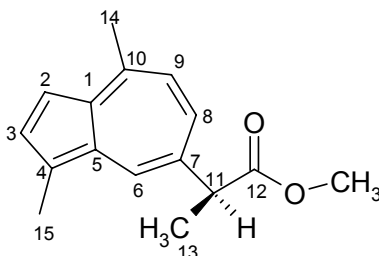
δ (ppm) = 8.89 (s, 1H, 6-H), 8.25 (br d, 1H, 8-H), 7.69-7.68 (d, 1H, 3-H, $^3J_{2,3} = 3.7$ Hz), 7.32-7.31 (d, 1H, 2-H, $^3J_{2,3} = 3.7$ Hz), 7.12-7.09 (d, 1H, 9-H, $^3J_{8,9} = 11.0$ Hz), 4.9 (br m, 1H, 11-H), 4.49-4.40 (br s*, -OCH₃), 2.91-2.90 (s*, 3H, 14-Me), 2.76 (s, 3H, 15-Me), 2.23 (br d*, 3H, 13-Me).

Die Signale des Verschiebungsreagenzes sind nicht angegeben.

* überlappende Signale.

7.7 Synthesen

7.7.1 (S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäuremethylester (13)



In einem getrockneten Zweihalskolben wurden 0.42 g (1.83 mmol) Chamazulencarbonsäure (2) in 50 ml einer Mischung aus Methanol:Benzol (1:4) gelöst. Dazu wurden 1.5 ml (3.0 mmol) einer 2.0 M Trimethylsilyldiazomethan-Lösung in Hexan langsam bei Raumtemperatur zugetropft, und eine Stunde lang gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde eingeeengt. Nach chromatographischer Reinigung (Fließmittel: Hexan/Ethylacetat 85:15, R_f -Wert: 0.5) wurde das Produkt (13) als dunkelblaues Öl erhalten.

Ausbeute: 0.290 g (0.65%), dunkelblaues Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3424, 3155, 2360, 2254, 1734, 1457, 1386, 1205, 1170, 1096.

¹H-NMR (CDCl₃; 400MHz):

δ (ppm) = 8.21-8.20 (d, 1H, 6-H, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.64-7.63 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.44-7.43 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.28-7.27 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.00-6.98 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 3.88-3.85 (q, 1H, 11-H, ³J_{11,13} = 7.2 Hz), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 2.83 (s, 3H, 14-Me), 2.66 (s, 3H, 15-Me), 1.61-1.60 (d, 3H, 13-Me, ³J_{11,13} = 7.2 Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 100.5 MHz):

δ (ppm) = 175.26 (C=O), 145.31 (C=C), 137.36 (C=C), 136.65 (C=C), 136.07 (C=C), 135.71 (C=C), 133.77 (C=C), 131.59 (C=C), 126.69 (C=C), 125.00 (C=C), 113.96 (C=C), 52.12 (O-CH₃), 48.92 (α -C), 24.09 (14-Me), 19.42 (15-Me), 12.90 (13-Me).

EI-MS (70 eV, 80 °C):

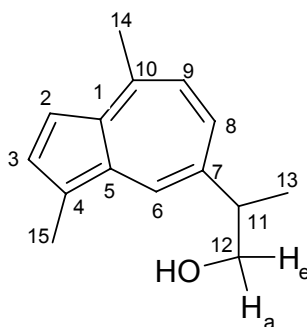
m/z (%) = 242 (100) [M^+], 183 (87.36) [$\text{M}^+ - \text{COOCH}_3$], 243 (82.25) [$\text{M}^+ + 1$], 168 (57.77), 155 (56.57).

Elementaranalyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2$ (242.31)

Ber.: C 79.33 H 7.48

Gef.: C 79.48 H 7.41

7.7.2 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20)



0.30 g (1.24 mmol) Chamazulencarbonsäuremethylester (13) wurden in 5 ml absolutem Diethylether gelöst. Die Lösung ließ man unter Rühren bei 0 °C in eine Suspension von 0.06 g (1.6 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 20 ml absolutem Diethylether eintropfen. Nach 1stündigem Rühren wurde die Lösung auf Eis gegossen. In einem 100 ml Scheidetrichter wurde die Etherphase mit je 3*30 ml 1 M HCl und Wasser ausgeschüttelt und über wasserfreies Natriumsulfat getrocknet. Die Etherphase wurde filtriert und eingeeengt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. (Kieselgel, 3*27 cm, Fließmittel: Hexan/tert-Butylmethylether 4:6, R_f -Wert: 0.46).

Ausbeute: 0.25 g (95%), blaues Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3420, 3000, 2980, 2200, 1415, 1320, 1205, 1040.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.17-8.16 (d, 1H, 6-H, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.65-7.64 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.39-7.37 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.28-7.27 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.03-7.01 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 3.80-3.79 (d, 2H, 12-H, ³J_{11,12} = 6.8 Hz), 3.14-3.09 (m, 1H, 11-H, ³J_{11,12} = 6.8 Hz, ³J_{11,13} = 7.1 Hz), 2.84 (s, 3H, 14-Me), 2.66 (s, 3H, 15-Me), 1.38-1.37 (d, 3H, 13-Me, ³J_{11,13} = 7.1 Hz).

^1H -NMR (C_6D_6 ; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.15 (s, 1H, 6-H), 7.68-7.67 (d, 1H, 3-H, $^3J_{2,3} = 3.4$ Hz), 7.31-7.30 (d, 1H, 2-H, $^3J_{2,3} = 3.4$ Hz), 7.17-7.16 (d, 1H, 8-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz), 6.76-6.74 (d, 1H, 9-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz), 3.48-3.46 (dd, 2H, 12-H, $^3J_{12,11} = 6.8$ Hz, $^2J_{12a,12e} = 10.3$ Hz), 2.80-2.78 (q, 1H, 11-H, $^3J_{13,11} = 7.1$ Hz), 2.60 (s, 6H, 14-,15-Me), 1.18-1.16 (d, 3H, 13-Me, $^3J_{13,11} = 7.1$ Hz).

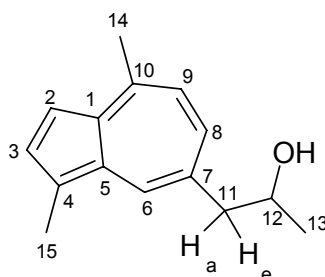
^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 144.89 (C=C), 137.29 (C=C), 136.52 (C=C), 135.94 (C=C), 135.66 (C=C), 134.26 (C=C), 133.90 (C=C), 125.91 (C=C), 125.07 (C=C), 113.42 (C=C), 69.02 (C-12), 46.21 (C-11), 24.07 (C-14), 18.45 (C-13), 12.90 (C-15).

EI-MS (70 eV, 80 °C):

m/z (%) = 183 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$], 214 (96.18) [M^+], 215 (74.04) [$\text{M}^+ + 1$], 168 (69.82).

Elementaranalyse:	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}$	(214.31)
Ber.:	C 84.11	H 8.41
Gef.:	C 83.89	H 8.35

7.7.3 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-2-ol (19)

0.65 g (3.64 mmol) N-Bromsuccinimid (NBS) wurden in 100 ml Benzol gelöst und zu einer Lösung von 0.60 g (3.04 mmol) Guajazulen (16) in 30 ml Benzol zugefügt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktion beendet war, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer auf ca. 20 ml reduziert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC, Kieselgel 60 F₂₅₄, 5*10 cm, Fließmittel: n-Hexan, 3-4malige Entwicklung) kontrolliert.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, 3*25 cm, Fließmittel: n-Hexan) gereinigt.

Während der Elution bildeten sich 6 Zonen. Die dritte blaue Fraktion war das Hauptprodukt (R_f -Wert: 0.45). Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, wobei die Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C war.

Das blaue Öl enthielt 7-(2-Bromo-1-methylethyl)-1,4-dimethylazulen (17) zusammen mit 7-(2-Bromopropyl)-1,4-dimethylazulen im Verhältnis 1:1. Es wurde als Rückstand bei -20 °C unter Argon aufbewahrt. Wegen Instabilität konnten weitere Reinigungen nicht durchgeführt werden.

^1H -NMR (C_6D_6 ; 500MHz):

δ (ppm) = 7.99 (s*, 1H, 6-H), 7.65 (d*, 1H, 3-H), 7.29 (d*, 1H, 2-H), 6.94-6.93 (dd*, 1H, 8-H), 6.70-6.66 (d*, 1H, 9-H), 4.01-3.99 (m, 1H, CHBr , $^3J = 7.0$ Hz), 3.26-3.23 (dd, 1H, CHHBr , $J = 6.0, 10$ Hz), 3.14-3.11 (dd, 1H, CHHBr , $J = 8.0, 10$ Hz), 3.09-3.06 (t [theoret. dd], 1H, CHHCHBr , $J = 7.4$ Hz), 2.92-2.90 (m, 1H, CHCH_2Br), 2.84-2.80 (dd, 1H, CHHCHBr , $J = 7.4, 13.9$ Hz), 2.56 (s*, 6H, 14- und 15-Me), 1.38-1.37 (d, 3H, CHBrCH_3 , $J = 7.0$ Hz), 1.22-1.20 (d, 3H, CHCH_3 , $J = 6.9$ Hz).

* überlappende Signale.

EI-MS (70 eV, 30°C):

m/z (%) = 278 (100) [M^+], 276 (95.38) [M^+], 169 (85.98) [$\text{M}^+ - \text{CHBrCH}_3$], 183 (43.74) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Br}$].

Der Rückstand wurde in 80 ml einer Mischung aus Wasser/Dioxan (1:1) aufgenommen und 1 h lang bei 80 °C hydrolysiert. Nach Abkühlung wurde mit n-Hexan ausgeschüttelt. Die blaue organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

Ein ^1H -NMR-Spektrum wurde aufgenommen. Das Produkt bestand nur aus 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-2-ol (19).

Die Umkristallisation erfolgte aus n-Hexan bei -20 °C. Die Substanz war unter diesen Bedingungen einen Monat lang stabil.

Ausbeute: 0.21 g (26%), blaues Öl.

IR (KBr):

ν (cm^{-1}) = 3320, 2987, 2900, 1560, 1545, 1420, 1350, 1120, 1112.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.15-8.14 (d, 1H, 6-H, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.65-7.64 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.39-7.37 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.8 Hz), 7.28-7.27 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.00-6.98 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 4.12-4.08 (br m, 1H, 12-H, ³J_{13,12} = 6.2 Hz), 2.98-2.94 (dd, 1H, 11-H, ²J_{11a,11e} = 13.4 Hz, ³J_{11,12} = 4.8 Hz), 2.88-2.84 (dd, 1H, 11-H, ²J_{11a,11e} = 13.4 Hz, ³J_{11,12} = 8.1 Hz), 2.84 (s, 3H, 14-Me), 2.65 (s, 3H, 15-Me), 1.31-1.30 (d, 3H, 13-Me, ³J_{12,13} = 6.2 Hz).

¹H-NMR (C₆D₆; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.15 (s, 1H, 6-H), 7.68-7.67 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.4 Hz), 7.31-7.30 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.4 Hz), 7.17-7.16 (d, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 6.76-6.74 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 3.75-3.74 (m, 1H, 12-H, ³J_{12,11} = 6.9 Hz), 2.63-2.61 (t [theoret. dd], 2H, 11-H, ³J_{12,11} = 6.9 Hz), 2.59 (s, 6H, 14-,15-Me), 1.05-1.04 (d, 3H, 13-Me, ³J_{13,12} = 6.2 Hz).

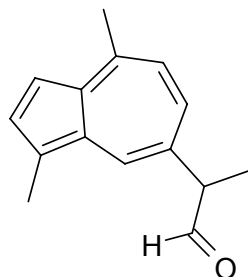
¹³C-NMR (CDCl₃; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 144.89 (C=C), 137.29 (C=C), 137.38 (C=C), 136.51 (C=C), 135.74 (C=C), 135.68 (C=C), 129.51 (C=C), 125.87 (C=C), 124.79 (C=C), 113.42 (C=C), 69.65 (C-12), 50.10 (C-11), 24.07 (C-14), 22.73 (C-13), 12.88 (C-15).

EI-MS (70 eV, 100 °C):

m/z (%) = 169 (100) [M⁺-C₂H₅O], 214 (97.67) [M⁺], 153 (88.01), 215 (79.59) [M⁺+1].

Elementaranalyse:	C ₁₅ H ₁₈ O	(214.31)
Ber.:	C 84.11	H 8.41
Gef.:	C 84.20	H 8.33

7.7.4 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionaldehyd (21)

0.20 g (0.83 mmol) Chamazulencarbonsäuremethylester (13) wurden in 20 ml n-Hexan unter Argonstrom in einem 50 ml Dreihalskolben gelöst. Die Lösung wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. 0.83 ml Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL; 1.0 M Hexan-Lösung) wurden zu der gekühlten Lösung zugetropft. Man ließ bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 Stunde lang rühren. Mit 5%iger auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlter Salzsäure-Lösung wurde die Reaktion gestoppt. Die wässrige Phase wurde mit Natriumsulfat gesättigt. Die Hexanphase wurde mit Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer entfernt.

Das blaue Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, $2 \times 25\text{ cm}$, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_f -Wert: 0.6).

Ausbeute: 0.08 g (45%), blaues Öl.

IR (Film):

$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)} = 3400, 3000, 2980, 1700, 1405, 1395, 1118, 1000, 800.$

$^1\text{H-NMR (CDCl}_3\text{; 500 MHz):}$

$\delta\text{ (ppm)} = 9.81\text{ (s, 1H, CHO)}, 8.05\text{ (s, 1H, 6-H)}, 7.68\text{--}7.67\text{ (d, 1H, 3-H, }^3J_{2,3} = 3.7\text{ Hz)}, 7.33\text{--}7.32\text{ (d, 1H, 2-H, }^3J_{2,3} = 3.7\text{ Hz)}, 7.28\text{--}7.26\text{ (d, 1H, 8-H, }^3J_{8,9} = 10.5\text{ Hz)}, 7.04\text{--}7.02\text{ (d, 1H, 9-H, }^3J_{8,9} = 10.5\text{ Hz)}, 3.80\text{--}3.77\text{ (q, 1H, 11-H, }^3J_{11,13} = 7.1\text{ Hz)}, 2.85\text{ (s, 3H, 14-Me)}, 2.65\text{ (s, 3H, 15-Me)}, 1.55\text{--}1.53\text{ (d, 3H, 13-Me, }^3J_{11,13} = 7.1\text{ Hz)}.$

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 201.00 (C=O), 145.56 (C=C), 137.45 (C=C), 137.15 (C=C), 136.44 (C=C), 135.76 (C=C), 134.99 (C=C), 128.45 (C=C), 127.00 (C=C), 125.22 (C=C), 114.45 (C=C), 56.68 (C-11), 24.11 (C-14), 15.84 (C-12), 12.89 (C-15).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 183 (100) [M^+ -CHO], 212 (92.92) [M^+], 153 (52.83), 168 (44.92), 213 (32.72) [M^++1].

HR-MS [M^+]: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}$

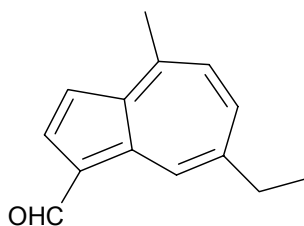
Ber.: 212.1201

Gef.: 212.1193

Elementaranalyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}$ (212.29)

Ber.: C 84.91 H 7.55

Gef.: C 84.13 H 7.41

7.7.5 7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd (Chamaviolin) (28)

0.39 g (2.5 mmol) pulverisiertes Kaliumpermanganat wurden in 30 ml über Molekularsieb getrocknetem Benzol suspendiert. Dazu fügt man 0.3 g Dicyclohexyl-18-krone-6. Die Lösung wurde nun violett. 0.36 g (1.9 mmol) Chamazulen (3) wurden in 5 ml über Molekularsieb getrocknetem Benzol gelöst und zu der Permanganat-Lösung zugefügt. Die Reaktion wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur im verschlossenen Kolben stark gerührt. Nach Filtration wurde Benzol am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C abrotiert. Der blaue Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 3*20 cm, Fließmittel: n-Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_F -Wert: 0.68).

Die dem Aldehyd (28) entsprechenden Fraktion wurde vorsichtig bei einer Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C eingengt.

Die zuerst eluierte blaue Fraktion - R_F -Wert: 0.9 entspricht Chamazulen (3) - wurde bis zu 95% zurückgewonnen. 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-ethanon (26) entstand bis zu 1%. Es hat einen R_F -Wert von 0.75.

Ausbeute: 0.004 g (1%), violetttes Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3450, 3010, 2980, 2435, 1650, 1410, 1280, 1090, 890.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 10.30 (s, 1H, CHO), 9.65 (s, 1H, 6-H), 8.18-8.17 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 4.5 Hz), 7.71-7.69 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 7.48-7.46 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 7.27-7.20 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 4.5 Hz), 2.98 (q, 2H, -CH₂CH₃, ³J = 7.6 Hz), 2.93 (s, 3H, 14-Me), 1.41-1.39 (t, 3H, -CH₂CH₃, ³J = 7.6 Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 186.59 (C=O), 147.88 (C=C), 145.57 (C=C), 144.4 (C=C), 141.71 (C=C), 139.57 (C=C), 138.97 (C=C), 138.93 (C=C), 131.10 (C=C), 125.52 (C=C), 115.60 (C=C), 29.68 (C-12), 24.81 (C-14), 17.05 (C-13).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 198 (100) [M^+], 197 (66.10) [M^+-1], 183 (28.49) [M^+-CH_3], 169 (18.94) [M^+-CHO], 155 (17.99).

HR-MS [M^+]: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$

Ber.: 198.1045

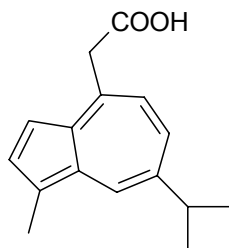
Gef.: 198.1032

Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$ (198.26)

Ber.: C 84.81 H 7.11

Gef.: C 64.45 H 9.82*

* sehr labile Substanz.

7.7.6 (7-Isopropyl-1-methylazulen-4-yl)-essigsäure (29)⁷⁵

130 ml absoluter Diethylether wurden in einem Dreihalskolben unter einem Argonstrom mit 3.0 ml (21 mmol) getrocknetem Diisopropylamin versetzt. Der auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlten Lösung gibt man 12.8 ml (21 mmol) Butyllithium zu. 4.5 g (21 mmol) des blauen Guajazulens (16) wurden in ca. 30 ml Diethylether gelöst und langsam dem gekühlten Gemisch zugetropft. Die nun grünlich-braune Lösung wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Stunde gerührt. In die weiterhin gekühlte Lösung wurde über einen Zeitraum von $1\frac{1}{2}$ Stunden getrocknetes CO_2 (wurde aus Trockeneis erzeugt und strömt zuvor durch konz. Schwefelsäure und Phosphorpentoxid) eingeleitet. Das Gemisch verfärbte sich dadurch blauviolett. Das gleiche Volumen Wasser wurde zugegeben und es wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase dreimal mit 1 M Natronlauge ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde erneut mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt und mit Diethylether ausgeschüttelt. Der Diethylether wurde abrotiert. Man erhielt 4.1 g eines blauvioletten Pulvers.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie (Kieselgel, $27 \times 4\text{ cm}$, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_f -Wert: 0.3) gereinigt.

Nach Umkristallisation aus n-Hexan wurden blaue nadelförmige Kristalle erhalten.

Die Säure (29) decarboxyliert während der Umkristallisation und nach kurzer Zeit (12 Stunden) in CHCl_3 . In Methanol dagegen ist (29) über mehrere Tage stabil.

Ausbeute: 3.04 g (60%), blaue nadelförmige Kristalle.

IR (KBr):

$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)} = 3200, 2987, 2900, 1720, 1600, 1410, 1212, 1160, 1010.$

^1H -NMR (CD_3OD ; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.21-8.20 (d, 1H, 6-H, $^4J_{6,8} = 1.8$ Hz), 7.61-7.60 (d, 1H, 3-H, $^3J_{2,3} = 3.7$ Hz), 7.47-7.44 (dd, 1H, 8-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz, $^4J_{6,8} = 1.8$ Hz), 7.23-7.22 (d, 1H, 2-H, $^3J_{2,3} = 3.7$ Hz), 7.04-7.02 (d, 1H, 9-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz), 4.08 (s, 2H, 11-H), 3.11-3.05 (m, 1H, 13-H, $^3J_{13,14} = 7.1$ Hz), 2.62 (s, 3H, 15-Me), 1.36-1.34 (d, 6H, 14-(Me)₂, $^3J_{13,14} = 7.1$ Hz).

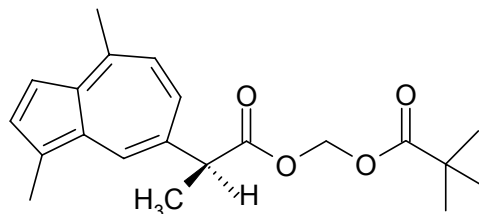
^{13}C -NMR (CD_3OD ; 125.65 MHz)

δ (ppm) = 175.26 (C=O), 141.84 (C=C), 140.98 (C=C), 138.87 (C=C), 138.10 (C=C), 137.99 (C=C), 135.70 (C=C), 134.01 (C=C), 126.58 (C=C), 126.40 (C=C), 113.76 (C=C), 44.02 (C-11), 39.44 (C-13), 25.11 (C-14), 12.84 (C-15).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 242 (6.6) [M^+], 198 (100) [$\text{M}^+ - \text{CO}_2$], 183 (95.80) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{COOH}$].

Elementaranalyse:	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2$	(242.31)
Ber.:	C 79.31	H 7.48
Gef.:	C 79.15	H 7.25

7.7.7 (S)-2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propionsäure-2,2-dimethylpropionyl-oxymethylester (30)¹¹

0.37 g (1.6 mmol) S-Chamazulencarbonsäure (2) wurden in 3 ml gelöst. Nach Zugabe von 0.23 ml (1.6 mmol) Pivalinsäurechlormethylester und 1.3 ml (3.5 mmol) Triethylamin wurde der Ansatz 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Aceton entfernt und der Rückstand mit 100 ml einer Wasser/Ethylactat-Mischung (1:1) aufgenommen.

Die organische Phase wurde abgetrennt, über Kaliumcarbonat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abrotiert.

Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel, 4*27 cm, Fließmittel: Hexan/tert-Butylmethylether 8:2, R_f -Wert: 0.55) fiel das Produkt (30) als blaues Öl mit an.

Ausbeute: 0.37 g (37%), blaues Öl mit einem starken charakteristischen Geruch.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3445, 3069, 2357, 1756, 1700, 1558, 1457, 1117, 1078, 990.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 8.20-8.19 (d, 1H, 6-H, ⁴J_{6,8} = 2.0 Hz), 7.65-7.64 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.43-7.40 (dd, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.0 Hz), 7.23-7.22 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.7 Hz), 7.04-6.97 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 10.5 Hz), 5.75-5.71 (2d, 2H, O-CH₂-O, ²J = 5.5 Hz), 3.89-3.80 (q, 1H, 11-H, ³J_{13,11} = 7.1 Hz), 2.83 (s, 3H, 14-Me), 2.62 (s, 3H, 15-Me), 1.62-1.61 (d, 3H, 13-Me, ³J_{13,11} = 7.1 Hz), 1.07 (s, 9H, 3*Me).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 176.89 (C=O), 173.36 (C=O), 145.28 (C=C), 137.32 (C=C), 136.7 (C=C), 135.65 (C=C), 135.49 (C=C), 133.63 (C=C), 130.50 (C=C), 126.87 (C=C), 124.89 (C=C), 114.10 (C=C), 79.35 (O-CH₂-O), 48.71 (CH, Säure-Teil), 38.52 (CH, Pivaloyl-Teil), 26.83 (3*Me, Pivaloyl-Teil), 24.00 (14-Me), 19.38 (15-Me), 12.84 (13-Me).

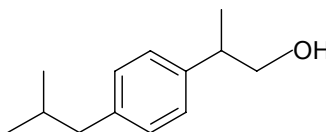
EI-MS (70 eV, 70°C):

m/z (%) = 343 (34.45) [$\text{M}^+ + 1$], 342 (100) [M^+], 183 (68.43) [$\text{M}^+ - (\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})$], 169 (8.58) [$\text{M}^+ - (\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})-\text{CH}_3$].

Elementaranalyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$ (342.43)

Ber.: C 73.60 H 7.60

Gef.: C 73.15 H 7.57

7.7.8 (\pm) -2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22)⁶⁴⁻⁶⁶

Eine Lösung von 1.18 g (5.7 mmol) (\pm) Ibuprofen in 10 ml absolutem Ether wurden in eine Suspension von 0.3 g (7.9 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 30 ml Ether langsam eingetropft. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion gestoppt. Wasser (ca. 50 ml) wurde vorsichtig dazu getropft. Die Etherphase wurde mit einer 10%igen Schwefelsäure ausgeschüttelt, bis sie klar geworden war. Danach wurde mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und der Ether entfernt.

Nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel, 4*27 cm, Fließmittel: Hexan/Ethylactat 3:1, R_F -Wert: 0.46) erhielt man das Produkt (22) als gelbes Öl.

Ausbeute: 0.95 g (86.8%), gelbes Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3300, 2980, 2900, 1540, 1470, 1410, 1050, 895.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 7.14-7.09 (m, 4H, aromat. H), 3.68-3.67 (d, 2H, CH₂OH, ³J = 6.8 Hz), 2.92-2.89 (m, 1H, CHCH₂OH, ³J = 6.8 Hz), 2.45-2.43 (d, 2H, Ar-CH₂, ³J = 7.1 Hz), 1.87-1.81 (m, 1H, CH(CH₃)₂, ³J = 6.7 Hz), 1.26-1.25 (d, 3H, CHCH₃, ³J = 7.1 Hz), 0.90-0.87 (d, 6H, CH(CH₃)₂, ³J = 6.7 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 140.73 (C=C), 140.06 (C=C), 129.37 (C=C), 127.16 (C=C), 68.79 (CH₂OH), 45.04 (Ar-CH₂), 42.03 (CHCH₃), 30.21 (CH(CH₃)₂), 22.41 (CH(CH₃)₂), 17.61 (CHCH₃).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 192 (68.7) [M^+], 161(100) [$M^+ - CH_2OH$], 119 (57.23), 131 (22.89).

Elementaranalyse: $C_{13}H_{20}O$ (192.30)

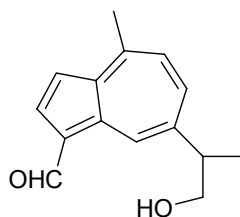
Ber.: C 81.25 H 10.42

Gef.: C 81.19 H 10.03

7.8 Oxidationsversuche

7.8.1 Oxidation von (20) mit Kaliumpermanganat in Benzol

7-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-4-methylazulen-1-carbaldehyd (25)



0.11 g (0.68 mmol) pulverisiertes Kaliumpermanganat wurden in 20 ml auf Molekularsieb getrocknetem Benzol suspendiert. Dazu fügt man 0.1 g Dicyclohexyl-18-krone-6. Die Lösung wurde nun violett. 0.11 g (0.51 mmol) 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20) wurden in 5 ml Benzol gelöst und zu der Permanganat-Lösung zugefügt. Die Reaktion wurde 6 Stunden lang bei Raumtemperatur stark gerührt. Nach Filtration wurde Benzol am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C abrotiert. Der blaue Rückstand wurde mittels präparativen Dünnschichtchromatographie gereinigt (PSC-Platten der Fa. Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20*20 cm, Dicke 0.5 mm, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_F-Wert: 0.3). Die dem Aldehyd (25) entsprechenden violetten Bande wurde ausgekratzt, mit Methanol eluiert, filtriert und bei einer Wasserbadtemperatur nicht höher als 30 °C abrotiert.

Die dem außerdem entstandenen Aldehyd (21) entsprechende blaue Schicht, R_F-Wert: 0.6 wurde mit einer Ausbeute von 1% gewonnen. Die analytischen Daten von (21) sind unter 7.7.4 zu finden.

Ausbeute (25): ca. 1 mg (< 1%), violettes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz):

δ (ppm) = 10.31 (s, 1H, CHO), 9.74 (s, 1H, 6-H), 8.20-8.19 (d, 1H, 3-H, $^3J_{2,3} = 4.4$ Hz), 7.73-7.72 (dd, 1H, 8-H, $^3J_{8,9} = 10.3$ Hz), 7.52-7.51 (d, 1H, 9-H, $^3J_{8,9} = 10.3$ Hz), 7.30-7.29 (d, 1H, 2-H, $^3J_{2,3} = 4.4$ Hz), 3.91-3.90 (d, 2H, CH_2OH , $^3J = 7.1$ Hz), 3.27 (m, 1H, 11-H, $^3J = 7.1$ Hz), 2.95 (s, 3H, 14-Me), 1.43-1.42 (d, 3H, 13-Me, $^3J = 7.1$ Hz).

EI-MS (70 eV, 140 °C):

m/z (%) = 228 (27.99) [M^+], 143 (100), 197 (45.69) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$], 187 (48.99).

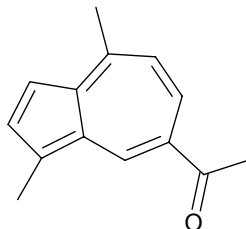
HR-MS [M^+]: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Ber.: 228.1150

Gef.: 228.1160

7.8.2 Oxidation von (20) mit Kaliumpermanganat in CH₂Cl₂

1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-ethanon (26)



20 μ l (0.06 mmol) Tris-[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]amin (TDA-1) wurden zu 0.2 g (1.28 mmol) Kaliumpermanganat in 10 ml CH₂Cl₂ zugefügt. 0.08 g (0.37 mmol) 2-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-1-ol (20) wurden in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst und zu der Kaliumpermanganat-Lösung gegeben. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde es mit CH₂Cl₂ verdünnt, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

Der blaue Rückstand wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt (PSC-Platten der Fa. Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 20*20 cm, Dicke 0.5 mm, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5)

Das Hauptprodukt - R_f-Wert: 0.75 - ist (26), eine labile Verbindung, deren Farbe sich an der Luft rasch in schwarzgrün umwandelt.

Ausbeute: ca. 25 mg (35%), blauvioletttes Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3400, 2950, 2340, 1640, 1210, 1100, 890.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz):

δ (ppm) = 9.00 (s, 1H, 6-H), 8.21-8.19 (d, 1H, 8-H, ³J_{8,9} = 11.0 Hz), 7.68-7.67 (d, 1H, 3-H, ³J_{2,3} = 3.9 Hz), 7.52-7.51 (d, 1H, 2-H, ³J_{2,3} = 3.9 Hz), 7.07-7.05 (d, 1H, 9-H, ³J_{8,9} = 11.0 Hz), 2.88 (s, 3H, 13-Me), 2.75 (s, 3H, 14-Me), 2.74 (s, 3H, 12-Me).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 198.80 (C=O), 149.46 (C=C), 137.26 (C=C), 136.90 (C=C), 136.06 (C=C), 134.29 (C=C), 133.87 (C=C), 133.41 (C=C), 128.01 (C=C), 124.38 (C=C), 119.03 (C=C), 26.89 (13-Me), 24.29 (14-Me), 13.24 (15-Me).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 198 (100) [M^+], 183 (88.40) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 155 (71.21) [$\text{M}^+ - \text{COCH}_3$], 197 (45.95), 169 (40.92).

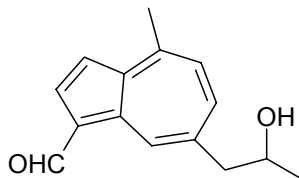
HR-MS [M^+]: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}$

Ber.: 198.1045

Gef.: 198.1034

7.8.3 Oxidation von (19) mit Bariummanganat

7-(2-Hydroxypropyl)-4-methylazulen-1-carbaldehyd (27)



0.1 g (0.46 mmol) 1-(3,8-Dimethylazulen-5-yl)-propan-2-ol (19) wurden in 10 ml CH_2Cl_2 gelöst. Dazu wurden 1.55 g Bariummanganat zugefügt. Nach 12 h Rühren bei Raumtemperatur wurde es mit 50 ml CH_2Cl_2 verdünnt, filtriert und das braunviolette Filtrat eingeengt.

Der Rückstand wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. (PSC-Platten der Fa. Merck, Kieselgel 60 F_{254} , 20*20 cm, Dicke 0.5 mm, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_f -Wert (27): 0.3)

Die dem Aldehyd (27) entsprechende Bande wurde ausgekratzt, mit Methanol eluiert, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: ca. 4 mg (3.8%), violettes Öl.

IR (Film):

ν (cm^{-1}) = 3410, 2895, 2365, 1620, 1400, 1211, 1020, 800.

^1H -NMR (CD_3OD ; 500 MHz):

δ (ppm) = 10.19 (s, 1H, CHO), 9.55 (s, 1H, 6-H), 8.20-8.19 (d, 1H, 3-H, $^3J_{2,3} = 4.3$ Hz), 7.83-7.81 (d, 1H, 8-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz), 7.61-7.59 (d, 1H, 9-H, $^3J_{8,9} = 10.5$ Hz), 7.35-7.34 (d, 1H, 2-H, $^3J_{2,3} = 4.3$ Hz), 4.09-4.08 (m, 1H, CHOH, $^3J = 6.2$ Hz), 3.03-3.02 (t [theoret. dd], 2H, CH_2CHOH , $^2J = 6.9$ Hz), 2.94 (s, 3H, 14-Me), 1.25-1.24 (d, 3H, CHOHCH_3 , $^3J = 6.2$ Hz).

^{13}C -NMR (CD_3OD ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 188.16 (C=O), 150.01 (C=C), 146.12 (C=C), 142.32 (C=C), 142.06 (C=C), 141.06 (C=C), 140.41 (C=C), 132.60 (C=C), 126.31 (C=C), 126.03 (C=C), 117.24 (C=C), 70.22 (CHOH), 50.92 (CH_2CHOH), 24.91 (CHOHCH_3), 23.25 (14-Me).

EI-MS (70 eV, 150 °C):

m/z (%) = 184 (100) [$\text{M}^+ - \text{CHOHCH}_3$], 228 (47.27) [M^+], 155 (38.32), 141 (17.52), 169 (11.95).

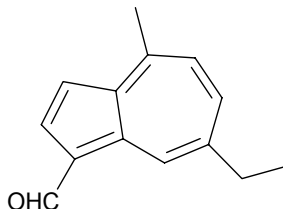
HR-MS [M^+]: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Ber.: 228.1150

Gef.: 228.1158

7.8.4 Oxidation von Chamazulen (3) mit DDQ

7-Ethyl-4-methylazulen-1-carbaldehyd (Chamaviolin) (28)



0.25 g (1.3 mmol) Chamazulen (3) wurden in 30 ml einer Wasser/Aceton-Mischung (1:9) gelöst. Dazu wurde 0.66 g (2.9 mmol) 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (DDQ) bei Raumtemperatur zugefügt. Nach 30 min. Rühren wurde die Reaktion gestoppt und über eine Säule (2*10 cm) mit Aluminiumoxid-N für Chromatographie filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und mit Benzol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt.

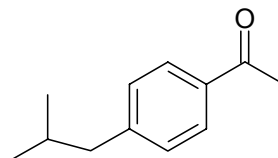
Der grüne Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, 3*20 cm, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_f -Wert: 0.68) gereinigt.

Es wurde kein Chamazulen (3) zurückgewonnen. Grüne Polymere, die auf der Säule geblieben waren, hatten sich neben anderen labilen Produkten gebildet.

Die Ausbeute an (28) betrug ca. 1 mg (< 1%) eines violetten Öls. Die analytischen Daten sind unter 7.7.5 zu finden.

7.8.5 Oxidation von (22) mit PDC in DMF

1-(4-Isobutylphenyl)-ethanon (23)



0.24 g (1.25 mmol) (\pm)-2-(4-Isobutylphenyl)-propan-1-ol (22) wurden in 3 ml getrocknetem DMF gelöst. Nach der Zugabe einer Lösung von 1.65 g (4.4 mmol) Pyridiniumdichromat (PDC) in DMF wurde die Mischung 72 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 200 ml Wasser verdünnt und der pH wurde mit Salzsäure auf 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde dann mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Nach Ansäuern mit Salzsäure (pH 2) wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Um die Phasentrennung zu verbessern, wurde gesättigte Kochsalz-Lösung zugefügt. Die abgetrennte Ethylacetatphase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie gereinigt (Kieselgel, 3*27, Fließmittel: Hexan:Ethylacetat:Methanol 65:30:5, R_f -Wert (23): 0.6, R_f -Wert (24): 0.42).

Die Ausbeute an Ibuprofen (24) betrug 0.11 g (42%). Es wurde als leicht gelbes Öl erhalten.*

* Die analytischen Daten entsprechen den publizierten Daten von Ibuprofen (24).⁶⁵

Ausbeute (23): 0.1 g (46%), gelbes Öl.

IR (Film):

ν (cm⁻¹) = 3063, 2923, 2360, 1685, 1599, 1359, 1180, 1078.

^1H -NMR (CDCl_3 ; 500 MHz):

δ (ppm) = 7.88-7.87 (d, 2H, aromat. H, $^3J = 7.3$ Hz), 7.23-7.22 (d, 2H, aromat. H, $^3J = 7.3$ Hz), 2.58 (s, 3H, COCH_3), 2.52 (d, 2H, Ar- CH_2 , $^3J = 7.3$ Hz), 1.93-1.90 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $^3J = 6.6$ Hz), 0.91-0.90 (d, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $^3J = 6.6$ Hz).

^{13}C -NMR (CDCl_3 ; 125.65 MHz):

δ (ppm) = 197.82 (C=O), 147.53 (C=C), 134.94 (C=C), 129.23 (C=C), 129.04 (C=C), 127.16 (C=C), 126.95 (C=C), 45.33 (Ar- CH_2), 30.06 ($(\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26.47 (COCH_3), 22.27 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

EI-MS (70 eV, 30 °C):

m/z (%) = 176(88.74) [M^+], 161(100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 133 (58.76) [$\text{M}^+ - \text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 119 (46.83).

Elementaranalyse: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}$ (176.26)

Ber.: C 81.77 H 9.14

Gef.: C 81.60 H 8.95

Literaturverzeichnis

- 1 - Hölzl, J.
"Kamille, die meistverwendete Arzneipflanze in Deutschland"
Therapeutikon 3, 555-560 (1989)
- 2 - Schilcher, H.
"Wirkungsweise und Anwendungsformen der Kamillenblüten. Handbuch für Apotheker, Ärzte, Heilpraktiker und weitere Heilberufe sowie für Medizin-, Pharmazie- und Biologiestudenten"
Berliner Medizinischer Verlagsanstalt GmbH, Berlin (2004)
- 3 - Schilcher, H.
"Die Kamille. Handbuch für Ärzte, Apotheker und andere Naturwissenschaftler"
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1987)
- 4 - Hitziger, T.; Höll, P.; Ramadan, M.; Dettmering, D.; Imming, P. und Hempel, B.
"Die alte junge Kamille"
Pharm. Ztg. 148, 372-380 (2003)
- 5 - (a) Goeters, S.; Imming, P.; Pawlitzki, G. und Hempel, B.
"On the absolute configuration of matricin"
Planta Med. 67, 292-294 (2001)

(b) Goeters, S.; Imming, P.; Pawlitzki, G. und Hempel, B.
"Absolute stereochemistry of guaianolides, of Matricin and its epimers, of yarrow proazulenes, and of chamazulene carboxylic acid"
Chirality 13, 337-341 (2001)
- 6 - Ammon, H. P. T.; Sabieraj, J. und Kaul, R.
"Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung von Kamillenextrakten und -inhaltsstoffen"
Dtsch. Apoth. Ztg. 136, 1821-1834 (1996)
- 7 - Safayhi, H.; Sabieraj, J.; Sailer, E.-R. und Ammon H. P. T.
"Chamazulene: An Antioxidant-Type Inhibitor of Leukotriene B₄ Formation"
Planta Med. 60, 410-413 (1994)
- 8 - Jakovlev, V.; Isaac, O. und Flaskamp, E.
"Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. VI: Untersuchungen zur antiphlogistischen Wirkung von Chamazulen und Matricin"
Planta Med. 49, 67-73 (1983)
- 9 - Della Loggia, R.; Carle, R.; Sosa, S. und Tubaro, A.
"Evaluation of the anti-inflammatory activity of chamomile preparations"
Planta Med. 56, 657-658 (1990)

-
- 10 - Stahl, E.
“Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufe. 1. Mitteil.: Cham-Azulencarbonsäure aus Schafgarbe“
Chem. Ber. 87, 202-205 (1953)
 - 11 - Goeters, S.
“Chemische und pharmakologische Charakterisierung eines anti-inflammatorisch wirksamen Pflanzeninhaltsstoffs, isoliert aus Asteraceen“
Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2001)
 - 12 - Robugen GmbH, Chamazulencarbonsäureverbindungen und deren Verwendung.
Dt. Offen. DE 10065683 A 15 Jul 2001 (Chem. Abstr. 135, 76647 (2001))
 - 13 - Goeters, S.; Lohmann, K.; Imming, P. und Hempel, B.
“A new COX-2-inhibitory agent isolated from *Matricaria recutita* L. and *Achillea millefolium* L. s.l.“
ESCOP Europ. Phytoj. 2, 1 (2001)
 - 14 - Hempel, B. und Hirschelmann, R.
“Kamille - Entzündungshemmende Wirkung von Inhaltsstoffen und Zubereitungen in vivo“
Dtsch. Apoth. Ztg. 138, 4237-4242 (1998)
 - 15 - Hock, K.
“Mitteilung aus der Stadtapotheke Bern. 1. Über gefärbte ätherische Öle“
Arch. Pharm. 221, 17-18 (1883)
 - 16 - Hohenadel, M.
“Untersuchungen über die Sekrete, 14. über das Sagapen“
Arch. Pharm. 233, 259-286 (1895)
 - 17 - Ruhemann, S. und Lewy, K.
“Über das blaue Öl des Braunkohlen-Generatorsteeres und seine Beziehung zu dem Azulen und den Sesquiterpenen des Kamillenöls“
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 60, 2459-2469 (1927)
 - 18 - Ruzicka, L. und Rudolph, E.
“Über die Sesquiterpenverbindungen des Kamillenöls und des Schafgarbenöls“
Helv. Chim. Acta 11, 253-261 (1928)
 - 19 - Koch, K.
“Untersuchungen über den Azulengehalt der Flores Chamomillae und der daraus hergestellten pharmazeutischen Zubereitungen“
Arch. Pharm. 280, 424-442 (1942)
 - 20 - Cekan, Z.; Herout, V. und Sorm, F.
“Isolation and properties of the pro-chamazulene from *Matricaria chamomilla* L., a further compound of the guaianolide group“
Collect. Czech. Chem. Commun. 19, 798-804 (1954)

-
- 21 - Cekan, Z.; Herout, V. und Sorm, F.
“Die Struktur von Matricin, ein Guajanolid aus der Kamille (*Matricaria chamomilla*)“
Collect. Czech. Chem. Commun. 22, 1921-1929 (1957)
- 22 - Flaskamp, E.; Zimmermann, G.; Nonnenmacher, G. und Isaac, O.
“Untersuchungen zur Charakterisierung des Prochamazulens Matricin aus *Matricaria chamomilla* L.“
Z. Naturforsch. 37b, 508-511 (1982)
- 23 - Luppold, E.
“*Matricaria chamomilla* –eine alte und neue Arzneipflanze“
Pharmazie in unserer Zeit, 13, 65-70 (1984)
- 24 - Rauschert, S.
“Nomenklatorische Probleme in der Gattung *Matricaria* L.“
Fol. Geobot. Phytotax. 9, 249-260 (1974)
- 25 - Wichtl, M.
“Teedrogen und Phytopharmaka“
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2002), 4. Aufl., S. 369-373
- 26 - www.plant-pictures.de
- 27 - Luckner, M.; Bessler, O. und Luckner, R.
“Vorschläge für den Drogen Teil des DAB 7. 26. Flores Chamomillae“
Pharmazie 21, 620-627 (1966)
- 28 - Monographie der Kommission E
“*Matricariae flos* (Kamillenblüten)“
Bundesanzeiger Nummer 228 vom 05.12.1984
- 29 - Fintelmann, V. und Weiß, R.
“Lehrbuch der Phytotherapie“
Hippokrates Verlag, Stuttgart (2002), 10. Aufl., S. 44-46
- 30 - Stahl, E. und Schild, W.
“Pharmazeutische Biologie 4 Drogenanalyse II“
G. Fischer Verlag, New York (1981), S. 391-395
- 31 - Ghassemi-Dehkordi, N.
“Analytik, Radioisotopenmarkierung und Pharmakokinetik von Matricin und Spiroäthern aus *Matricaria recutita* L.“
Dissertation, Philipps-Universität Marburg (1988)
- 32 - Ness, A.
“Hochdosierte, feste, matricinhaltige Kamillenzubereitungen“
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1995)
- 33 - Adam, K. und Becker, H.
“Analytik biogener Arzneistoffe. Pharmazeutische Biologie“
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2000), 4. Aufl., S. 380-385

-
- 34 - Spitzer, J.- C. und Steelink, C.
"Isolation of Matricin from *Artemisia caruthii*"
J. Pharm. Sci. 56, 650-651 (1967)
- 35 - Schneider, G. und Mielke, B.
"Zur Analytik der Bitterstoffe Absinthin, Artabsin und Matrizin aus *Artemisia absinthium* L. Teil II Isolierung und Gehaltsbestimmungen"
Dtsch. Apoth. Ztg. 119, 977-982 (1979)
- 36 - Belliardo, F. und Appendino, G.
"Preparative high performance-liquid chromatography isolation of the true proazulenes from *Artemisia arborescens* L."
J. Liq. Chromatogr. 4, 1601-1607 (1981)
- 37 - Belliardo, F.; Appendino, G. und Sacco, T.
"Preparative HPLC-separation of epimeric guaianolides"
J. Liq. Chromatogr. 6, 543-550 (1983)
- 38 - Herold, M. und Hannig, H.-J.
"Modifizierter Nachweis von Proazulen bei *Achillea spec.* als halbquantitative Bestimmung zur Vorselektion im Züchtungsverfahren"
Pharmazie 34, 41-42 (1979)
- 39 - Yarrow (*Millefolii herba*) monograph, European Pharmacopoeia (2002)
- 40 - Saberi, E.
"Eine Methode zur Bestimmung der Proazulene in Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) und Kamille (*Matricaria recutita* L.)"
Sci. Pharm. 58, 317-319 (1990)
- 41 - Soyke, B.
"Stabilisierung von Matricin in festen Kamillenzubereitungen"
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1991)
- 42 - Merfort, I.
"Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones"
J. Chromatogr. A 967, 115-130 (2002)
- 43 - Frey, H.-P. und Zieloff, K.
"Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie. Grundlagen und Praxis"
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1993)
- 44 - Schwedt, G.
"Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis"
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995), 1. Aufl., S. 324-329
- 45 - Jork, H. und Wimmer, H.
Literatursammlung quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatographie
- Darmstadt: GIT Verlag (1989). - Loseblatt-Sammlung. Mit Lfg. 12 Erscheinen eingestellt. ISBN 3-921956-19-6

-
- 46 - Kromidas, S.
"Validierung in der Analytik. Die Praxis der instrumentellen Analytik"
Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1999)
- 47 - Frei, R. W.
"A critical study of some parameters in quantitative in-situ investigations of thin layer chromatography by light absorption methods"
J. Chromatogr. 64, 285-295 (1972)
- 48 - Special-Workshop Achillea in Wien, November 1997
"Achillea: Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik und Wirkung"
Drogenreport 11, 29-42 (1998)
- 49 - Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Rücker, G. und Wichtl, M.
"DAB-10-Kommentar: Schafgarbenkraut, Millefolii herba"
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1996)
- 50 - Hernandez, L. R.; Catalan, C. A. N. und Joseph-Nathan, P.
"The chemistry of the genus Stevia (Asteraceae)"
Rev. Acad. Colomb. Cienc. 22, 229-279 (1998)
- 51 - Calderon, J. S.; Quijano, L.; Gomez, F. und Rios, T.
"Prochamazulene sesquiterpene lactones from Stevia serrata"
Phytochemistry 28, 3526-3527 (1989)
- 52 - Salmon, M.; Diaz, E. und Ortega, A.
"Christinine, a new epoxyguaianolide from Stevia serrata Cav."
J. Org. Chem. 38, 1759-1761 (1973)
- 53 - Sanchez-Arreola, E.; Cerda-Garcia-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Roma, L. und Hernandez, J. D.
"Longipinene derivatives from Stevia serrata"
Phytochemistry 39, 853-857 (1995)
- 54 - Kastner, U.; Glasl, S.; Jurenitsch, J. und Kubelka, W.
"Isolation and structure elucidation of the main proazulenes of cultivar Achillea collina Proa."
Planta Med. 58, Suppl. Issue I, A718 (1992)
- 55 - Schneider, G. und Mielke, B.
"Zur Analytik der Bitterstoffe Absinthin, Artabsin und Matrizin aus Artemisia absinthium L. Teil II: Isolierung und Gehaltsbestimmungen"
Dtsch. Apoth. Ztg. 119, 977-982 (1979)
- 56 - Ninomiya, S.-I.; Liu, F.-Z.; Nakagawa, H.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. und Sato, Y.
"Studies on chemical carcinogens and mutagens. XXXIX Effect of silicon and germanium substitutions on physicochemical properties and cytotoxicity of N-alkyl-N-nitrosoureas"
Chem. Pharm. Bull. 34, 3273-3278 (1986)

-
- 57 - Davies, N. M.
"Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years"
Clin. Pharmacokinet. 34, 101-154 (1998)
- 58 - Parker, D.
"NMR determination of enantiomeric purity"
Chem. Rev. 91, 1441-1457 (1991)
- 59 - Friebolin, H.
"Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung"
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1988), 1. Aufl., S. 269-278
- 60 - (a) Sitte, P.; Ziegler, H.; Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.
"Strasburger Lehrbuch der Botanik für Hochschulen"
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1998), 34. Aufl., S. 368-372
- (b) Keeton, W. T.
"Biological science"
Norton & Co., New York (1980), S. 334-344
- 61 - Nozoe, T.; Shindo, K.; Wakabayashi, H.; Kurihara, T. und Ishikawa, S.
"Unusual reactions of guaiazulene and synthesis of variously functionalized azulenes using these reactions"
Collect. Czech. Chem. Commun. 56, 991-1010 (1991)
- 62 - Li, M. K. W. und Scheuer, P. J.
"Halogenated blue pigments of a deep sea gorgonian"
Tetrahedron Lett. 25, 587-590 (1984)
- 63 - Stahl, E.
"Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufen, III. Mitteil.: Zur Konstitution der Cham-Azulencarbonsäure"
Chem. Ber. 87, 1626-1628 (1954)
- 64 - March, J.
"Advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms, and structures"
John Wiley & Sons, Inc., New York (1992), 4. Aufl.
- 65 - Basak, A.; Nag, A.; Bhattacharaya, G.; Mandal, S. und Nag, S.
"Chemoenzymatic synthesis of anti-inflammatory drugs in enantiomerically pure form"
Tetrahedron Asymmetry 11, 2403-2407 (2000)
- 66 - Bando, T.; Namba, Y. und Shishido, K.
"Lipase mediated asymmetric construction of 2-arylpropionic acids: enantiocontrolled synthesis of S-naproxen and S-ibuprofen"
Tetrahedron Asymmetry 8, 2159-2165 (1997)
- 67 - Ishibashi, H.; Maeki, M.; Yagi, J.; Ohba, M. und Kanai, T.
"A modification of a symmetric dihydroxylation approach to the synthesis of (S)-2-arylpropionic acids"
Tetrahedron 55, 6075-6086 (1999)

-
- 68 - Corey, E. J. und Schmidt, G.
"Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium chlorochromate in aprotic media"
Tetrahedron Lett. 20, 399-402 (1979)
- 69 - Sam, D. J. und Simmons, H. E.
"Crown Polyether Chemistry. Potassium permanganate oxidations in benzene"
J. Am. Chem. Soc. 94, 4024-4025 (1972)
- 70 - Srivastava, R. G. und Venkataramani, P. S.
"Barium manganate oxidation in organic synthesis: Part V: Oxidation of phenols"
Synth. Commun. 22, 35-45 (1992)
- 71 - Motl, O.; Repčák, M.; Buděšinský, M. und Ubík, K.
"Weitere Bestandteile des Kamillenöls, 3. Mitt."
Arch. Pharm. 316, 908-912 (1983)
- 72 - Treibs, W.
"Über bi- und polycyclische Azulene, XXVIII Oxydationsreaktionen an Azulenem"
Chem. Ber. 90, 761-764 (1957)
- 73 - Kohara, K.
"On the oxidation of guiazulene"
Bull. Chem. Soc. Jpn. 42, 3229-3233 (1969)
- 74 - Amemiya, T.; Yasunami, M. und Takase, K.
"The novel oxidation of 1-alkylazulenes to 1-acylazulenes with DDQ"
Chem. Lett. 587-590 (1977)
- 75 - McDonald, R. N.; Petty, H. E.; Wolfe, L. und Paukstelis, J. V.
"Nonbenzoid aromatic systems X. Formation, nuclear magnetic resonance, spectral identification, and reactions of both Meisenheimer type and methyleneazulenate anions"
J. Org. Chem. 39, 1877-1887 (1974)
- 76 - Neuwald, F.
"Über die entzündungswidrige Wirkung von Extractum Chamomillae Fluidum"
Süddeutsche Apoth. Ztg. 88, 362-363 (1948)
- 77 - Neuwald, F.
"Neuere Ergebnisse der Kamillenforschung"
Bull. Galenica 16, 155-160 (1953)
- 78 - Reinicke, M.; Barton, H. und Jung, F.
"Synthetische Azulene IV. Versuche zur Frage Struktur und Wirksamkeit"
Arch. Exper. Path. Pharmacol. 215, 579-589 (1952)
- 79 - Jung, F.; Wendler, M. und Reinicke, E.
"Über das antiphlogistische Prinzip der Kamille"
Naturwissenschaften 39, 23-24 (1952)

-
- 80 - Kristen, G. und Schmidt, W.
"Kamille und Azulene. Pharmakologie – Therapie - Galenik"
Arch. Pharm. 27, 105-114 (1957)
- 81 - Stahl, E.
"Über die Farbe des Ätherischen Öles von *Artemisia absinthium* L. und das Proazulen"
Naturwissenschaften 39, 571 (1952)
- 82 - Kunert, G.
"Vom Proazulen zum Postazulen"
Planta Med. 5, 4-6 (1957)
- 83 - Stahl, E.
"Der Einfluß der Destillationsdauer und der Wasserstoffionenkonzentrationen auf die Ausbeute an Azulen und äther. Öl bei der Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.)"
Pharm. Ind. 14, 305-307 (1952)
- 84 - Wagner, H.
"Pharmazeutische Biologie 2 - Drogen und ihre Inhaltsstoffe"
Fischer Verlag Stuttgart, New York (1988), 4. Aufl., S. 78-80
- 85 - Steinegger, E. und Hänsel, R.
"Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie"
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1988), 4. Aufl., S. 308-313
- 86 - USP 24 NF 19
"United States Pharmacopeia and National Formulary"
U. S. Pharmacopeial convention INC., Rockville (2000), Solutions / Test Solutions
- 87 - Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. und Feeney, P. J.
"Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings"
Adv. Drug Delivery Rev. 23, 3-25 (1997)
- 88 - Davies, N. M.
"Methods of analysis of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs"
J. Chromatogr. B 691, 229-261 (1997)
- 89 - Lunn, G. und Schmuff, N. R.
"HPLC methods for pharmaceutical analysis"
John Wiley & Sons, New York (1997), 1. Aufl., S. 929-950
- 90 - Higgins, J. D.; Gilmore, T. P.; Martellucci, S. A.; Bruce, R. D. und Brittain, H. G.
"Ibuprofen: Brittain, H. G. Analytical profiles of drug substances and excipients"
Academic Press, San Diego (2001), Vol. 27, S. 265-300

-
- 91 - Shah, V. P.; Midha, K. K.; Dighe, S.; McGilvery, I. J.; Skely, J. P.; Yacobi, A.; Layloff, T.; Viswanatahana, C. T.; Cook, C. E.; McDowall, R. D.; Pittman, K. A. und Spector, S.
"Conference Report Analytical methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and pharmacokinetic studies"
J. Pharm. Sci. 81, 309-314 (1992)
- 92 - Bressolle, F.; Bromit-Petit, M. und Audran, M.
"Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods applications to pharmacokinetics"
J. Chromatogr. B 686, 3-10 (1996)
- 93 - Causen, R.
"Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion"
J. Chromatogr. B 689, 175-180 (1997)
- 94 - Blanchard, J.
"Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis"
J. Chromatogr. 226, 455-460 (1981)
- 95 - Koivisto, P.
"Development of techniques and methods for drug analysis by packed capillary liquid chromatography with octadecylbonded silica and porous graphitic carbon columns"
Dissertation, Uppsala (2001)
- 96 - Bakkali, A.; Corta, E.; Berrueta, L. A.; Gallo, B. und Vicente, F.
"Study of the solid-phase extraction of diclofenac sodium, indomethacin and phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography"
J. Chromatogr. B 729, 139-145 (1999)
- 97 - Farrar, H.; Letzig, L. und Gill, M.
"Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma"
J. Chromatogr. B 780, 341-348 (2002)
- 98 - Veigel, S.; Kallenborn, R. und Huhnerfuss, H.
"Simultaneous solid-phase extraktion of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry"
J. Chromatogr. A 1023, 183-195 (2004)
- 99 - Seyberth, H. W.; Leonhardt, A.; Krauss, M.; Gieler, U.; Schweer, H. und Happle, R.
"In vivo formation of prostaglandin E₁ and prostaglandin E₂ in atopic dermatitis"
Br. J. Dermatol. 136, 337-340 (1997)
- 100 - Seyberth, H. W.; Schweer, H. und Watzer, B.
"Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry"
J. Chromatogr. B 652, 221-227 (1994)

-
- 101 – Gilman, A. G.; Limbird, L. E. und Hardmann, J. G.
“Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics“
McGraw-Hill Companies, Inc., New York (1996), 9. Aufl., S. 837-839
- 102 - Koch, H. P. und Ritschel, W. A.
“Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik“
Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg München (1986), S. 20
- 103 - Bauer, K. H.; Frömming, K.-H. und Führer, C.
“Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie“
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1999), 6. Aufl., S. 187-226
- 104 - Pfeifer, S.; Pfügel, P. und Borchert, H.-H.
“Biopharmazie, Pharmakokinetik - Bioverfügbarkeit - Biotransformation“
Ullstein-Mosby GmbH & Co. KG, Berlin-Wiesbaden (1995), 3. Aufl., S. 110-113
- 105 - Roholt, K.; Nielsen, B. und Kristensen, E.
“Pharmakokinetic studies with mecillinam and pivmecillinam“
Chemotherapy 21, 146-166 (1975)
- 106 - Roholt, K.; Nielsen, B. und Kristensen, E.
“Clinical pharmacology of pivampicillin“
Antimicrob. Agents Chemother. 6, 563-571 (1974)
- 107 - Lipka, E.; Lee, I.-D.; Langguth, P.; Spahn-Langguth, H.; Mutschler, E. und Amidon, G. L.
“Celiprolol double peak occurrence and gastric motility: Nonlinear mixed effects modeling of bioavailability data obtained in dogs“
J. Pharmacokin. Biopharm. 23, 267-286 (1995)
- 108 - Langguth, P.; Lee, K. M.; Spahn-Langguth, H. und Amidon, G. L.
“Variable gastric emptying and discontinuities in drug absorption profile: Dependence of rates and extent of cimetidine absorption on motility phase and pH“
Biopharm. Drug Dispos. 15, 719-746 (1994)
- 109 - Parr, A. F.; Beihn, R. M.; Franz, R. M.; Szpunar, G. J. und Jay, M.
“Correlation of ibuprofen bioavailability with gastrointestinal transit by scintigraphic monitoring of ¹⁷¹Er-labeled-sustained-release tablets“
Pharm. Res. 4, 486-491 (1987)
- 110 - Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, K. und Schäfer-Korting, M.
“Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie“
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2001), 8. Aufl., S. 466-472
- 111 - Lawson, J. A.; Patrono, C.; Ciabattoni, G. und Fitzgerald, G. A.
“Long-lived enzymatic metabolites of thromboxane B₂ in the human circulation“
Anal. Biochem. 155, 590-594 (1986)
- 112 - Gilroy, D. W.; Tomlinson, A. und Willoughby, D. A.
“Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation“
Europ. J. Pharmacol. 355, 211-217 (1998)

-
- 113 - Reinalter, S. C.; Jeck, N.; Brochhausen, C.; Watzler, B.; Nüsing, R. M.; Seyberth, H. W. und Kömhoff, M.
"Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E Syndrome/antenatal Bartter syndrome"
Kidney International 62, 253-260 (2002)
- 114 - Lipsky, L. P. E.; Abramson, S. B.; Crofford, L. DuBosis, R. N.; Simon, L. S.; van de Putte, L. B.
"The classification of the cyclooxygenase inhibitors"
J. Rheumatol. 25, 2298-2303 (1998)
- 115 - Fuchs, B.
"Celecoxib und Rofecoxib, zwei COX-2-selektive Entzündungshemmer"
Pharm. Ztg. 146, 1229-1238 (2001)
- 116 - Gupta, R. A. und Dubios, R. N.
"Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2"
Nat. Rev. Cancer 1, 11-21 (2001)
- 117 - Huss, U.
"Studies on the effects of plant and food constituents on cyclooxygenase-2. Aspects in inflammation and cancer"
Dissertation, Uppsala (2003)
- 118 - Marx, J.
"Inflammation and cancer: the link grows stronger"
Science 306, 966-968 (2004)
- 119 - Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M. und Du Bois, R. N.
"Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells"
Cell. 93, 705-716 (1998)
- 120 - Kraul, M. A. und Schmidt, F.
"Über die wachstumshemmende Wirkung bestimmter Extrakte aus Flores Chamomillae und eines synthetischen Azulenpräparates auf experimentelle Mäusetumoren"
Arch. Pharm. 62, 66-74 (1957)
- 121 - Holz, W. und Miething, H.
"Wirkstoffe in wässrigen Kamillenaufgüssen. 2 Mitteilung: Freisetzung von Ätherisch-Öl-Komponenten"
Pharmazie 49, 53-55 (1994)

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
COX	Cyclooxygenase
DC	Dünnschichtchromatographie
δ	Chemische Verschiebung
Fa.	Firma
Gew.	Gewicht
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
I.S.	Interner Standard
LC	Liquid chromatography
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
Me	Methyl
NSAIDs	Non Steroidal Antiinflammatory Drugs
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	part per million
ppb	part per billion
PG	Prostaglandin
RP	Reversed Phase
rpm	revolution per minute
s.	siehe
S.	Standard
Tab.	Tabelle
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioletter Bereich des Spektrums